

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 19. srpanj 2016.

Ivona Vukoje

639/PI

**Primjena hladne plazme na
inaktivaciju *Escherichia coli* MG1655**

Rad je izrađen u Laboratoriju za procesno-prehrambeno inženjerstvo na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Zorana Hercega Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te uz pomoć Višnje Stulić, mag. ing.

ZAHVALA

Zahvaljujem se prof. dr. sc Zoranu Hercegu, koji mi je omogućio izvedbu ovog rada, na njegovoj pomoći i znanju koje mi je prenio tokom izvedbe ovog diplomskog rada. Zahvaljujem se i Višnji Stulić, mag. ing. na stručnoj pomoći u tehnološkoj izvedbi dijela znanstvenog rada, ali i na savjetima i vremenu koje mi je posvetila, na njenom stručnom vodstvu i prijateljskoj podršci.

Također se zahvaljujem svojoj obitelji, koja je uvijek bila uz mene, neizmjereno hvala na podršci, razumijevanju i vjerovanju. Zahvaljujem se svima koji su na bilo koji način pomogli pri izradi i pisanju ovog rada uključujući mog dečka i najbliže prijatelje i prijateljice.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo
Laboratorij za procesno-prehrambeno inženjerstvo

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

PRIMJENA HLADNE PLAZME NA INAKTIVACIJU *ESCHERICHIA COLI* MG1655

Ivona Vukoje, 639/PI

Sažetak:

Cilj ovog rada bio je istražiti inaktivacijski učinak hladne plazme generirane u plinskoj fazi na čistu kulturu *Escherichia coli* MG1655 te oksidacijski stres na stanice *E. coli* nakon provedenog tretmana hladnom plazmom. Parametri koji su se promatrali bili su vrijeme izloženosti (5 i 10 min), frekvencija (60, 90 i 120 Hz), plin (zrak i argon), polaritet (+ i -) i električna provodljivost (100 i 800 μScm^{-1}). Broj stanica izražen kao log CFU mL⁻¹ određivan je prije i nakon tretiranja. Na tretiranim uzorcima određivano je stvaranje slobodnih radikala (H₂O₂), rekuperacija stanica, promjena temperature, stvaranje biofilma te istjecanje staničnog sadržaja pri valnim duljinama od 260 i 280 nm. Učinci pet varijabli i njihovih kombinacija na inaktivaciju *Escherichie coli* MG1655 su statistički analizirani metodom odzivne površine (RSM). Rezultati su pokazali bolju inaktivaciju i manju revitalizaciju primjenom argona i dužeg vremena tretiranja. Bolja inaktivacija je postignuta uz električnu provodljivost 100 μScm^{-1} , ali je kod svih tretiranih uzoraka došlo do rekuperacije stanica nakon 18 h inkubacije pri 30 °C.

Ključne riječi: hladna plazma, *Escherichia Coli*, inaktivacija, oksidacijski stres, rekuperacija

Rad sadrži: 68 stranica, 11 slika, 10 tablica, 28 literaturnih navoda, 2 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: prof.dr.sc. Zoran Herceg

Pomoć pri izradi: Višnja Stulić, mag. ing.

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Prof.dr.sc. Zoran Herceg
2. Izv.prof.dr.sc. Anet Ježek Jambrek
3. Izv.prof.dr.sc. Ksenija Markov
4. Prof.dr.sc. Rajka Božanić (zamjena)

Datum obrane: 19. srpnja 2016.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Food Engineering
Laboratory for Food Processing Engineering

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology

APPLICATION OF COLD PLASMA ON INACTIVATION OF *ESCHERICHIA COLI* MG1655

Ivona Vukoje, 639/PI

Abstract:

The aim of this study was to investigate the effect of cold plasma generated in gas phase on inactivation of *Escherichia coli* MG1655 and to determine the oxidative stress of cells after the treatment. The processing parameters were exposure time (5 and 10 min), frequency (60, 90 and 120 Hz), gas (air or argon), polarity (+ or -) and electrical conductivity ($100 \mu\text{Scm}^{-1}$ and $800 \mu\text{Scm}^{-1}$). The number of cells expressed as $\log \text{CFU mL}^{-1}$ was determined before and after treatment. In treated samples forming of free radicals (H_2O_2), recuperation of cells, change of temperature, biofilm assay and leakage of cells macromolecules on wave lengths of 260 and 280 nm was determined. The effects of five variables and their combinations on inactivation of *Escherichia coli* MG1655 were statistically analyzed through response surface methodology (RSM). The results showed better inactivation and reduced recuperation with applied argon, and longer exposure time with the electrical conductivity of $100 \mu\text{Scm}^{-1}$. After the treatment and incubation for 18 h at 30 °C all samples were recuperated.

Keywords: cold plasma, *Escherichia Coli*, oxidative stress, inactivation, recuperation

Thesis contains: 68 pages, 11 figures, 10 tables, 28 references, 2 supplements

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: *PhD. Zoran Herceg, full professor*

Technical support and assistance: *Višnja Stulić, master of science*

Reviewers:

1. PhD. Zoran, Herceg, full professor
2. PhD. Anet, Režek Jambrak, full professor
3. PhD. Ksenija, Markov, full professor
4. PhD. Rajka, Božanić, full professor (substitute)

Thesis defended: 19 July 2016

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. PLAZMA	2
2.2. VRSTE PLAZME	3
2.2.1. Plazme ovisno o stupnju ionizacije.....	3
2.2.2. Plazme ovisno o gustoći	3
2.2.3. Plazme ovisno o termodinamičkoj ravnoteži.....	4
2.3. ATMOSFERSKA PLINSKA PLAZMA	5
2.3.1. Prijenos energije i zagrijavanje.....	5
2.3.2. Važni fizikalni i kemijski procesi	7
2.3.3. Kemija visoko-tlačne (atmosferske) plazme.....	8
2.3.4. Raspad kod plinske faze	9
2.3.5. Izvori atmosferske hladne plazme	10
2.3.5.1. Pražnjenja istosmjerne struje sa niskom frekvencijom	10
2.3.5.1.1. Koronalno pražnjenje	11
2.3.5.1.2. Pražnjenje preko dielektrične barijere (DBD)	12
2.3.5.2. Radio-frekventna, RF plazma	12
2.3.5.3. Mikrovalna pražnjenja	12
2.4. TEKUĆINSKA PLAZMA.....	13
2.4.1. Konfiguracija elektroda	13
2.5. PRIMJENA HLADNE PLAZME U PREHRAMBENOJ INDUSTRIJI.....	14
2.6. <i>ESCHERICHIA COLI</i>	15
3. EKSPERIMENTALNI DIO	18
3.1. MATERIJALI.....	18
3.1.1. Test mikroorganizam i njegovo čuvanje.....	18
3.1.2. Hranjive podloge	18
3.1.3. Kemikalije	19
3.1.4. Oprema i uređaji	19
3.1.5. Izvor plinske plazme.....	20
3.2. METODE.....	21
3.2.1. Priprema uzorka.....	21
3.2.2. Obrada uzoraka plinskom plazmom	21
3.2.3. Metoda brojenja poraslih kolonija	23
3.2.4. Biofilm.....	23

3.2.5.	Rekuperacija	24
3.2.6.	Istjecanje staničnog sadržaja.....	24
3.2.7.	Određivanje koncentracije slobodnih radikala	25
3.2.8.	Obrada podataka	25
4.	REZULTATI I RASPRAVA	27
4.1.	REZULTATI.....	27
4.2.	RASPRAVA	50
4.2.1.	Log CFUmL ⁻¹	50
4.2.2.	Temperatura.....	52
4.2.3.	Slobodni radikali.....	54
4.2.4.	Biofilm.....	55
4.2.5.	Istjecanje staničnog sadržaja pri 260 nm	57
4.2.6.	Istjecanje staničnog sadržaja pri 280 nm	58
4.2.7.	Rekuperacija	59
5.	ZAKLJUČCI.....	63
6.	LITERATURA.....	64
7.	PRILOZI	67
7.1.	POPIS SLIKOVNIH PRIKAZA RADA	67
7.2.	POPIS TABLICA RADA	68

1. UVOD

Posljednjih godina, potražnja za minimalno procesiranom hranom je u stalnom porastu najviše zbog promicanja zdravog životnog stila i djelomično zbog povećane potražnje potrošača za raznovrsnošću i dostupnosti. Rizik od kontaminacije hrane kvarenjem i patogenim mikroorganizmima je zabrinjavajući jer se većina tih proizvoda konzumira bez daljnje pripreme ili kuhanja.

Odgovor na povećani zahtjev potrošača za visoko kvalitetnom, sigurnom i praktičnom hranom, jedna je od najvažnijih inovacija u prehrambenoj industriji odnosno to je razvoj ne-toplinskih procesa dizajniranih da očuvaju hranu i istovremeno limitiraju utjecaj tih procesa na nutritivnu i senzorsku kvalitetu hrane. Većina novih tehnologija i tehnologija koje su tek u nastajanju za procesiranje hrane inaktiviraju mikroorganizme drugačijim mehanizmom nego od zagrijavanja. Te tehnologije uključuju visoki hidrostatski tlak, pulsirajuće električno polje, primjenu UV svjetla, ultrazvuka te u zadnje vrijeme ne-termalne tj. hladne plazme. Upravo je tretman hladnom plazmom jedna od najviše obećavajućih tehnologija za očuvanje hrane jer promiče učinkovitu inaktivaciju različitih tipova mikroorganizama uključujući spore i viruse te određene kvasce i gljive. Brojne studije pokazuju efikasnost plazme u uništavanju mikroorganizama, no malo se zna o utjecaju plazme na strukturu hrane. Utvrđeno je da plazma ulazi u interakcije sa komponentama hrane poput vode, masti, proteina, ugljikohidrata i fenolnih spojeva. Posljednjih godina raste zainteresiranost za plazma izboje u vodi zbog njihovih potencijalnih primjena za različite tehnologije.

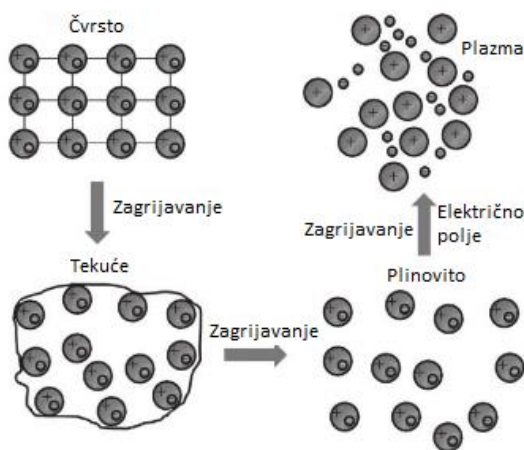
U ovom radu atmosferskom plinskom plazmom tretirana je suspenzija bakterije *Escherichia coli* MG1655, gram negativne bakterije, u čistoj kulturi. Cilj ovog rada bio je odrediti učinkovitost inaktivacije čiste kulture *Escherichia coli* MG1655 hladnom plinskom plazmom pri atmosferskom tlaku uz različite uvjete tretiranja te odrediti oksidacijski stres stanica nakon tretmana.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. PLAZMA

Plazma je prvi put identificirana u Crookes-ovoj cijevi, od strane Williama Crookesa 1879. godine pri čemu ju je nazvao materijom koja zrači. Prirodu te materije kod Crookes-ove cijevi je zatim identificirao britanski fizičar Thomson 1897. godine. Sam pojam plazma je stvoren od strane Irving Langmuir-a 1928. godine, a on opisuje područje koje sadrži uravnoteženi broj nabijenih iona i elektrona (Fernandez i Thompson, 2012).

Plazma je jedno od četiri osnovna stanja tvari, pri čemu su ostala tri čvrsto, tekuće i plinovito. Plazma se može stvoriti zagrijavanjem plina ili izlaganjem plina jakom elektromagnetskom polju apliciranom pomoću lasera ili generatora mikrovalova, a prijelaz stanja materije djelovanjem topline možemo vidjeti na slici 1. Na taj način se povećava ili smanjuje broj elektrona što stvara pozitivno ili negativno nabijene čestice – ione, a sve to je popraćeno disocijacijom molekularnih veza, ukoliko su one prisutne. Prisutnost značajne količine nabijenih čestica (nosača) čini plazmu električki provodnom te stoga snažno odgovara na elektromagnetska polja. Kao i plin, plazma nema definirani oblik ili volumen, osim ako nije zatočena u određenom spremniku. Za razliku od plina, pod utjecajem magnetskog polja plazma može tvoriti strukture koje nalikuju na niti, zrake te dvostruke slojeve (Chu i Lu, 2014).



Slika 1. Prikaz prijelaza stanja materije primjenom topline (prema Chu i Lu, 2014)

Upravo je plazma najrasprostranjeniji oblik materije u svemiru točnije zvijezdama i Suncu, a ne atomi i molekule. Plazma u svemiru čini više od 99% materije. Prirodne plazme na Zemlji, poput munja i polarne svijetlosti su također često promatrane još od 17. stoljeća. U 20. stoljeću dolazi do brzog napretka u razvoju, dijagnostici i primjeni plazme (Chu i Lu, 2014).

2.2. VRSTE PLAZME

Budući da se plazma sastoji od elektrona, pozitivnih iona i neutralnih čestica, ona može biti opisana s obzirom na stupanj ionizacije, gustoću, termodinamičku ravnotežu i s obzirom na brojne druge faktore stoga se plazma može klasificirati na različite načine (Chu i Lu, 2014).

2.2.1. Plazme ovisno o stupnju ionizacije

Stupanj ionizacije se može definirati preko sljedeće formule: $\alpha_i = N_i / (N_i + N_n)$, gdje je N_i gustoća iona, a N_n je gustoća neutrona. Odgovor bilo koje plazme na magnetsko polje te električna provodljivost (konduktivnost) plazme određeni su parametrom α_i tj. stupnjem ionizacije. Plazme sa vrijednostima stupnja ionizacije između 10^{-6} i 10^{-3} su slabo ionizirane. Stupanj ionizacije je određen temperaturom elektrona u plazmi pa se iz tog razloga slabo ionizirane plazme još nazivaju i nisko-temperaturne, hladne ili ne-termalne plazme. U većini komora za procesiranje plazmom stupanj ionizacije je manji od 10^{-4} . Stupanj ionizacije induktivno spregnute plazme (eng. inductively coupled plasma, ICP) i elektron ciklotronske rezonancije je značajno veći, 10^{-2} . Plazma sa $\alpha_i \approx 1$ je potpuno ionizirana plazma te se na nju referira kao termalna ili vruća plazma. U ovakve plazme spadaju fuzijska plazma, međuplanetarni medij te unutrašnjost zvijezdi (npr. Sunca) (Chu i Lu, 2014).

2.2.2. Plazme ovisno o gustoći

Visoko-tlačna plazma ili plazma visoke gustoće odnosi se na plazme sa česticama gustoće veće od $10^{15-18} \text{ cm}^{-3}$. Visoki broj iona i slobodnih radikala visokotlačne plazme ne samo da povećava ekscitaciju/ionizacijsku koliziju nego također povećava razinu bombardiranja ionima. Stoga se visoko-tlačna plazma stvorena sa ICP i kapaciteteno spregnutom plazmom (eng. capacitively coupled plasma, CCP) često koristi za graviranje po mikroelektronici, proizvodnju nanomaterijala, kao dekontaminacijska plazma itd. (Chu i Lu, 2014).

Nisko-tlačna plazma ili plazma male gustoće odnosi se na plazmu sa česticama gustoće manje od $10^{12-14} \text{ cm}^{-3}$. Za razliku od visoko-tlačne plazme, kod nisko-tlačne je razina kolizije čestica zanemariva. Nisko-tlačni plazma sistemi zahtijevaju skupocjene vakuum sisteme i

pumpe, te sve više, kroz posljednja dva desetljeća, raste interes za zamjenom tih sistema sa neravnotežnim hladnim atmosferskim plazmama (Bardos i Barankova, 2010).

2.2.3. Plazme ovisno o termodinamičkoj ravnoteži

Na osnovi relativne temperature između elektrona, iona i neutrona, plazme se klasificiraju kao termalne ravnotežne, lokalne termalne ravnotežne ili ne-termalne ravnotežne plazme. Temperatura elektrona (T_e), iona (T_i) i neutrona (T_n) su identične kod tople ravnotežne plazme. To je posljedica česte kolizije između elektrona i iona/neutrona u visokotemperaturnoj i visokotlačnoj plazmi. Primjeri ove plazme su npr. prirodni fuzijski reaktor (Sunce) i magnetsko polje.

Kod ne-termalne ili hladne ravnotežne plazme moment prijenosa između laganijih elektrona i težih čestica (iona i neutrona) nije efikasan te snaga primijenjena u plazmi favorizira elektrone. Stoga je T_e značajno veća od T_i i T_n , a to znači sljedeće: $T_e \gg T_i, T_n$. Ne-termalne ravnotežne plazme se stvaraju korona pražnjenjem, svjetlećim pražnjenjem, pražnjenjem u obliku svjetlosnog luka, kapacitetno spojenim pražnjenjem, induktivno spojenim pražnjenjem, valovima zagrijane plazme itd. Primjena ne-termalne ravnotežne plazme se proširila te pokriva okolišno inženjerstvo, aeronautiku i svemirsko inženjerstvo, biomedicinu, tekstilnu tehnologiju, analitičku kemiju i brojna druga područja.

Za razliku od termalne i ne-termalne ravnotežne plazme, lokalna termalna ravnotežna plazma je u kvazi-ravnoteži jer su T_e , T_i i T_n u istom rasponu. T_i kod lokalne termalne ravnotežne plazme je 3 000 – 10 000 K (0,4 – 1 eV), što je značajno više nego kod ne-termalne plazme, ali je zato plazmina T_e značajno manja (0,4 – 1 eV u usporedbi sa 2 – 10 eV kod ne-termalne plazme). Lokalna termalna ravnotežna plazma može biti stvorena od strane istosmjernje struje (eng. direct current, DC), radio frekventnih (eng. radio-frequency, RF) lukova ili od strane induktivno spojenog izvora. Plazme sa plinovitim pražnjenjem i procesne plazme imaju gustoću u rasponu od 10^7 - 10^{14} cm⁻³, a njihova energija elektrona se kreće od 1 do 100 eV (Chu i Lu, 2014).

2.3. ATMOSFERSKA PLINSKA PLAZMA

Atmosferske plazme (eng. atmospheric pressure plasmas, APPs) su vrlo raznolike i imaju široku primjenu npr. u redukciji otpada i pročišćavanju plinova, kemijskoj pretvorbi i sintezi kao što su produkcija ozona, sinteza nanočestica, površinsko funkcionaliziranje materijala te dezinfekcija.

Relativno je jednostavno proizvesti neravnotežno plinsko pražnjenje pri niskom tlaku sa temperaturama plina sličnima sobnoj temperaturi. Međutim prilikom porasta pritiska, plinska pražnjenja imaju tendenciju da postanu nestabilna i skupljena. Zato je kod atmosferskog tlaka neophodno primijeniti posebne geometrije, elektrode ili metodu pobuđivanja kako bi se dobila neravnotežna plazma kod koje temperature plina ostaju značajno niže nego temperatura elektrona (Chu i Lu, 2014).

Nisko tlačne plazme ($10^{-4} - 10^{-2}$ kPa) su hladne ili ne-LTE ravnotežne plazme (eng. non-local thermodynamic equilibrium plasmas, non-LTE). Temperatura težih čestica je niža od onih elektronskih. Neelastične kolizije između elektrona i težih čestica su ionizirajuće tj. pobuđujuće i te kolizije ne podižu temperaturu težih čestica. Kada tlak postane veći, broj kolizija se povećava. One pokreću i kemiju plazme (preko neelastične kolizije) i zagrijavanje većih čestica (preko elastične kolizije) te se tada razlika u temperaturi između elektrona i težih čestica reducira; plazma stanje postaje bliže toplim ravnotežnim plazmama (eng. local thermodynamic or thermal equilibrium plasma, LTE), ali ga ne dosegne. Gustoća dolazne struje značajno utječe na plazma stanje bilo da je LTE ili ne-LTE. Općenito, visoka gustoća struje dovodi do LTE plazme dok ne-LTE plazme favoriziraju izvore struje sa niskom gustoćom ili pulsirajuće izvore. Lokalna termodinamička ravnoteža je iskonski pojam. Ona značajno ovisi o vrsti izvora plazme i odlučujući je faktor kod određivanja njene primjene (Tendero i sur., 2006).

2.3.1. Prijenos energije i zagrijavanje

Atmosferska plazma (APP) se dobiva provođenjem određenog napona tj. voltaže preko dvije elektrode. Tada se električna energija, koja je zadržana u električnom polju u području između elektroda, prevodi u plazmu akceleracijom nabijenih čestica. Općenito je pri visokom tlaku ograničen direktan električni prijenos sa električnog polja na teže čestice (ione) te se

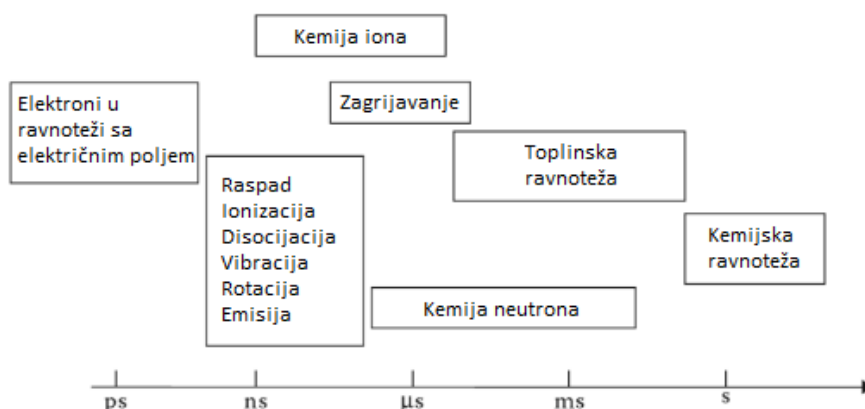
tada uglavnom elektroni zagrijavaju od strane električnog polja. Prijenos energije elektrona na teže čestice (molekule plina) se odvija preko ionizacije, ekscitacije, disocijacije molekula te elastične kolizije. U mnogim stacionarnim visoko-tlačnim pražnjenjima temperatura elektrona se kreće između 1 i 3 eV, a u ovom slučaju, kod atomskih plinova, prijenos energije sa elektrona na teže čestice je uglavnom dominiran elastičnom kolizijom. U slučaju sa molekularnim plinovima vibracijsko pobuđivanje je uglavnom dominantno u rasponu navedenih temperatura elektrona. Važno je znati da prijenos energije sa električnog polja na elektrone može biti značajno učinkovitiji nego posljedični kolizijski prijenos energije sa elektrona na teže čestice i to najviše zbog velike razlike u masi. Tijekom svake kolizije između elektrona i težih čestica prenese se frakcija od otprilike 10^{-4} energije. Stoga, temperatura plina može biti značajno niža nego temperatura elektrona.

Kod plazme u atomskom plinu sa temperaturom elektrona ispod 3eV prijenos energije sa elektrona na plin elastičnom kolizijom se određuje preko koeficijenta brzine elastične kolizije (sudara). Tipične brzine elastične kolizije su reda $10^{-13} \text{ m}^3\text{s}^{-1}$. Sa porastom tlaka, frekvencija kolizije se povećava, što uzrokuje efikasniji prijenos energije i posljedično zagrijavanje plina. Razlika između temperature elektrona i plina može biti procijenjena preko izjednačavanja prosječne energije, dobivene od elektrona u električnom polju između dvije kolizije, te prosječne energije prenesene u koliziji između elektrona i neutrona. Time dobivamo Finkelburg i Maecker jednadžbu koja pokazuje da se razlika između temperature plina i elektrona povećava povećanjem pritiska i električnog polja. Temperatura plina raste kako raste gustoća elektrona i veličina plazme. Plazme malih dimenzija i niske gustoće će stoga uvijek imati manju temperaturu plina nego plazme velikih dimenzija i velike gustoće.

Kako bi se dobila netermalna plazma kod koje je T_e puno veća od temperature plina, T_g ($T_e \gg T_g$) tj. plazma koja radi pri temperaturi sličnoj sobnoj temperaturi, može se primijeniti jedan ili više sljedećih koraka: sprječavanje termalizacije/ravnoteže pulsiranjem plazme, povećanje električnog polja korištenjem oštih elektroda kao kod korona pražnjenja, redukcija broja elektrona ili struje uvođenjem dielektričnih ili rezistentnih barijera, poboljšanje prijenosa topline preko prisilne konveksije, upotrebe plinova sa velikim kapacitetom prijenosa topline (helij) te redukcijom veličine plazme. Važno je znati da plazme proizvedene pobuđivanjem kontinuiranom jednosmjernom strujom, koje imaju relativno veliki volumen, pri atmosferskom tlaku često imaju povećanu T_g koja može biti približno jednaka T_e . Zato je najprirodnija visoko-tlačna plazma upravo termalna (vruća) plazma. (Chu i Lu, 2014)

2.3.2. Važni fizikalni i kemijski procesi

Različiti fizikalni i kemijski procesi koji su važni ili koji direktno utječu na svojstva plazme pri atmosferskom tlaku čine određeni vremenski period sastavljen od 12 različitih procesa. Najvažniji fizikalni i kemijski procesi kod atmosferske plazme su prikazani na slici 2. gdje vidimo da je najbrži proces reda ps te određuje ravnotežu elektrona u primijenjenom električnom polju. Tipična frekvencija kolizije neutrona pri atmosferskom tlaku je reda 10^9 s^{-1} pri sobnoj temperaturi. Ionizacija nastupa otprilike u ns. Za zagrijavanje težih čestica potrebno je nešto više vremena i to od 100 ns do 1 μs . Kod kemijskih reakcija tj. formacije radikala treba razmotriti tri različita vremenska perioda, i to: reakcije elektron inducirane disocijacije za povećanje temperature-započinju na vremenskoj skali pri nekoliko ns, kemija radikala uslijed interakcije sa neutronima - događa se na vremenskoj skali pri μs te ionske reakcije koje su važne kod plazmi veće gustoće-tipično se javljaju između 10 ns i 1 μs .



Slika 2. Shematski prikaz tipičnih važnih procesa kroz vrijeme (prema Chu i Lu, 2010)

Obično je potrebno nekoliko ms za termalizaciju koja se javlja pri temperaturama između T_e i T_g . Termalizacija je neophodna za kemijsku ravnotežu te se stoga ona postiže na vremenskoj skali u sekundama. Upravo zbog ovakve vremenske skale procesa, kemija plazme je u većini slučajeva neravnotežna kemija. Razina reakcija značajno ovisi o temperaturi i broju elektrona, pa stoga različite plazme mogu imati različite vremenske skale za ionske i elektronske procese (Chu i Lu, 2014).

2.3.3. Kemija visoko-tlačne (atmosferske) plazme

Dva primjera reakcija koje su baza dvije velike primjene atmosferske plazme su: formiranje ozona, $O + O_2 + O_2 \longrightarrow O_3 + O_2$ i formiranje ksenona, $Xen + 2 Xe \longrightarrow Xe_2^* + Xe$. U reakciji formiranja ksenona, Xe_2^* radikal emitira svjetlost u ultravioletnom (UV) području pri oko 172 nm.

Druga reakcija pri atmosferskom tlaku je reakcija ionske kemije. U situaciji sa atomskim plemenitim plinovima, pri visokom tlaku i ne previše visokoj temperaturi, atomski ioni se brzo prevode u molekularne ione: $Ar^+ + 2 Ar \longrightarrow Ar^{2+} + Ar$. Tipična brzina disocijativne elektron-ion rekombinacije (npr. $e + Ar^{2+} \longrightarrow Ar^n + Ar$) je reda od 10^{13} – $10^{14} \text{ m}^3\text{s}^{-1}$, što je nekoliko redova veličine brže u usporedbi sa trodijelnom elektron-ion rekombinacijom ili radioaktivnom elektron-ion rekombinacijom kod koje je drugi elektron ili foton neophodan za istovremeno očuvanje energije i momenta sile: $Ar^+ + 2e \longrightarrow 2Ar + e$ [$k \sim 10^{-39} \text{ m}^6\text{s}^{-1}$ ($Te=1\text{eV}$)], $Ar^+ + e \longrightarrow Ar + hv$ [$k \sim 3 \times 10^{-19} \text{ m}^3\text{s}^{-1}$ ($Te= 1 \text{ eV}$)]. Zbog niskih razina rekombinacije atomskih iona u nisko-tlačnim plazmama, difuzija je često dominantni mehanizam gubitka čestica, dok pri atmosferskom tlaku (kod kojeg je često gustoća elektrona u rasponu od 10^{20} - 10^{21} m^{-3}) disocijativna elektron-ion rekombinacija pa stoga te rekombinacije često postaju dominantne u usporedbi sa gubitcima na stjenkama. Također, kod visokog tlaka disocijativna rekombinacija i općenito kemija iona, mogu imati važnu ulogu u stvaranju radikala kada je gustoća iona značajno velika (10^{20} - 10^{21} m^{-3} ili viša). Tipični primjer je stvaranje OH na rubu plazma strimera, koje može biti objašnjeno kao izmjena naboja i reakcije disocijativne elektron-ion rekombinacije kada se baza strimera sastoji ugl. od atomskih iona i kada je voda potpuno ionizirana: $H^+ + H_2O \longrightarrow H_2O^+ + H$ ($k \sim 7 \times 10^{-15} \text{ m}^3\text{s}^{-1}$), $H_2O^+ + H_2O \longrightarrow H_3O^+ + OH$ ($k \sim 10^{-15} \text{ m}^3\text{s}^{-1}$), $H_3O^+ + e \longrightarrow OH + 2H$ [$k \sim 10^{-13} \text{ m}^3\text{s}^{-1}$ ($Te = 1\text{eV}$)]. U elektronegativnim plinovima, negativna kemija iona može biti značajno drugačija pri visokom tlaku u usporedbi pri nisko-tlačnim plazmama. Pri niskom tlaku vezanje se uglavnom odvija kroz disocijaciju, što zahtjeva određenu nakupljenu količinu energije za samu disocijaciju. Tipični primjer je: $O_2 + e \longrightarrow O + O^-$. No, pri atmosferskom tlaku trodijelno vezanje igra ključnu ulogu u balansiranju nabijenih čestica: $O_2 + e + M \longrightarrow O_2^- + M$, pri čemu je M treći dio koji predstavlja tešku česticu. Ovo je naročito važno kod pulsirajućih pražnjenja u zraku kod kojih je prethodno navedena reakcija trodijelnog vezanja često dominantan mehanizam za uklanjanje nabijenih čestica u fazi rekombinacije.

Dodatna razlika kod visokog tlaka u usporedbi sa niskim tlakom je snažno elektroničko gašenje pobuđenih stanja, što u određenim situacijama značajno smanjuje emisiju. Postoje brojni primjeri poput pobuđenog OH koji uzrokuje tipičnu OH - emisijsku vrpcu pri otprilike 306 nm. Pobuđeno stanje može biti snažno ugašeno (te je posljedično i emisija drastično reducirana) zbog kompetitivne reakcije: $\text{OH} + \text{M} \longrightarrow \text{OH} + \text{M}^*$, gdje je M kolizijska teška čestica. Ovaj fenomen ne samo da ima važnu ulogu u primjeni kao što je proizvodnja efikasnih lampi baziranih na pražnjenju plina, ali je također od velike važnosti za temeljna istraživanja i dijagnostiku kod određivanja OH gustoće laser-induciranom fluorescencijom (Chu i Lu, 2014).

2.3.4. Raspad kod plinske faze

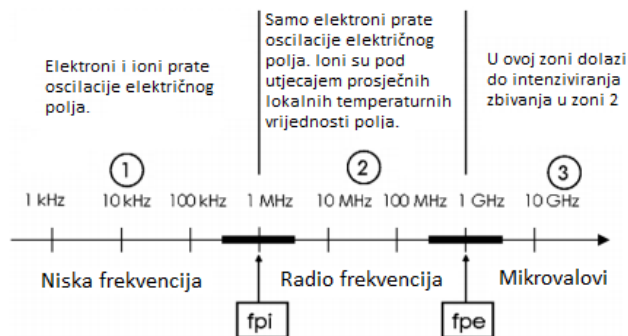
Električni raspad plinova podrazumijeva formiranje kanala pražnjenja između dvije elektrode razdvojene procijepom sa plinom, u trenutku kada primijenjena voltaža prijeđe određenu vrijednost. Taj proces je popraćen određenim brojem efekata kao što su svjetlosni bljesci te zvukovi.

Glavni mehanizam raspada je kolizijska ionizacija popraćena vezanjem elektrona. Drugi mogući mehanizam uključuje fotoionizaciju i otpuštanje elektrona sa negativnih iona. Elektroni ubrzavaju u električnom polju sudarajući se sa molekulama plina i na taj način stvaraju nove elektrone. Kako se snaga električnog polja povećava, povećava se i kolizijska ionizacija što dovodi do stvaranja nezavisnih elektron valova sve dok se prostor za pražnjenje između elektroda ne ispuni plazmom. Plazma se sastoji od pozitivnih iona ostavljenih iza prethodnog vala i elektrona formiranih od strane sljedećih valova. Širenje plazme je uzrokovano konstantnim stvaranjem novih valova. Dolazi do stvaranja tzv. strimera. Ako plazma dosegne katodu dolazi do potpunog raspada u području pražnjenja između elektroda. U suprotnom, dolazi do djelomičnih pražnjenja.

Fotoni stvoreni na vrhu elektron vala dovode do stvaranja sekundarnih valova koji od strimera rastu prema naprijed i u stranu. Razvoj valova vodi do povećanja električnog polja u području pražnjenja u smjeru katode. Brzina povećanja pozitivnih strimera je 10^8 - 10^9 cm s^{-1} .

2.3.5. Izvori atmosfarske hladne plazme

Veliki broj različitih izvora hladne atmosfarske plazme je dizajniran i razvijen od prvog, DBD reaktora (eng. dielectric barrier discharges, DBD) izrađenog u 19. stoljeću od strane von Siemens-a u svrhu proizvodnje ozona.



Slika 3. Primjer raspona varijacije za f_{pi} (ionsku frekvenciju) i f_{pe} (frekvencije elektrona) u hladnoj plazmi tj. svjetlećim izbojima (Tendero i sur., 2006)

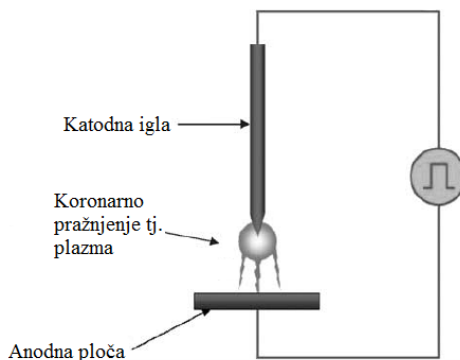
Frekvencija ekscitacije je važna kod atmosfarske plazme jer utječe na ponašanje elektrona i iona, što se može vidjeti na slici 3. Prema tome izvore atmosfarske plazme možemo klasificirati s obzirom na njihov način ekscitacije. Najistaknutiji izvori su pražnjenja istosmjerne struje i nisko frekventna pražnjenja, radio-frekventne plazme te mikrovalna pražnjenja, a imamo i pulsirajuća pražnjenja istosmjerne struje u kombinaciji sa niskom frekvencijom te pulsirajuću radio-frekventnu plazmu.

2.3.5.1. Pražnjenja istosmjerne struje sa niskom frekvencijom

Ovisno o njihovom dizajnu, ova pražnjenja mogu raditi kontinuiranim načinom ili pulsirajućim. Pulsirajući način rada onemogućuje unos velike količine energije u pražnjenja, a i zagrijavanje sustava je limitirano. Kod kontinuiranog načina rada plazma može biti u dva oblika, kao termalna plazmena baklja te kao novije razvijeni oblik: olovki – slična plazmena baklja. Što se tiče pulsirajućeg načina rada, ono obuhvaća koronalno pražnjenje (eng. corona discharge) i pražnjenje preko dielektrične barijere (eng. dielectric barrier discharge, DBD).

2.3.5.1.1. Koronalno pražnjenje

Koronalno pražnjenje je ne-LTE pražnjenje sa niskom gustoćom struje. Uređaj, vidljiv na slici 4., sastoji se od katodne igle i anodne ploče (tretirani materijal), a izvor napajanja istosmjerne struje je pulsirajući. Plazma stvara svjetleću krunu oko igle i upravo iz tog razloga i posjeduje naziv koronalno. Ovisno o polarnosti igle, korona može biti negativna i pozitivna.



Slika 4. Princip koronarnog pražnjenja (prema Tendera i sur., 2006)

Kod primjene negativnog visokog napona na iglu dobiva se negativno koronalno pražnjenje. Tada se pozitivni ioni ubrzavaju prema igli gdje se zatim sekundarni elektroni emitiraju i ubrzavaju u plazmu: ta pokretna fronta visoko-energetskih elektrona (oko 10 eV) iza koje se nalaze i nisko-energetski elektroni (oko 1 eV) naziva se strimer tj. električni izboj. Nakon toga dolazi do neelastične kolizije između visoko-energetskih elektrona i teških čestica te izazivaju stvaranje kemijski reaktivnih vrsta. Pražnjenje struje je vrlo nisko: 10^{-10} do 10^{-5} A. Postoji i pozitivna korona: pozitivno polarizirana igla ponaša se kao anoda (Bartnikas i McMahon, 1979).

Kako je volumen plazme vrlo mali, glavni nedostatak korone, što se tiče površinskog tretiranja, je mala veličina tretirane površine. Kako bi se povećala površina kod površinskog tretiranja, katodna igla se može zamijeniti ravnom elektrodom koja je paralelna s tretiranom površinom: taj sustav stvara mikro strimere koji su okomiti na područje između elektroda. Strimeri se uvijek stvaraju na istom mjestu, što uzrokuje ne-homogeno tretiranje na površini materijala. Kako bi se izbjegao ovaj problem, razvijeno je pražnjenje preko dielektrične barijere (Tendero i sur., 2006).

Korona dovodi do: razvoja svjetla, UV radijacije, razvoja zvuka (šištanje ili pucketanje uzrokovano eksplozivnim ekspanzijama plina), stvaranja ozona, razvoja nitritne i raznih

drugih kiselina, stvaranja soli (mogu se ponekad uočiti u obliku bijelih praškastih čestica na dnu), stvaranja drugih kemikalija (ovisno o materijalu izolatora), mehaničke erozije površina kao posljedice bombardiranja ionima, razvoja topline (jako malo, i primarno u izolatoru) te depozita ugljika (Mayerhoff, 2007).

2.3.5.1.2. Pražnjenje preko dielektrične barijere (DBD)

Najpopularniji izvori hladne atmosferske plazme se baziraju na pražnjenju preko dielektrične barijere tj. DBD-u. Dielektrična barijera na jednoj ili dvije elektrode može potisnuti i, u kombinaciji sa visokom frekvencijom struje, spriječiti stvaranje strimera. Postoji veliki broj različitih dizajna, konstrukcija, elektroda, oblika te dielektričnih barijera koje se koriste prilikom stvaranja ovakve plazme za različite primjene. Kod svih DBD sustava, akumulirani površinski naboji na dielektričnoj barijeri moraju biti neutralizirani npr. pomoću bipolarne pulsirajuće istosmjerne struje u bilo statičnom ili pokretnom režimu plina (Tendera i sur., 2006).

2.3.5.2. Radio-frekventna, RF plazma

Što se tiče njihove strukture, RF izvori plazme mogu raditi sa strujom visoke ili niske snage. To utječe na svojstva plazme, a samim time i na njenu potencijalnu primjenu. U RF plazme sa pražnjenjem visoke snage spadaju: induktivno spregnuta plazma tj. ICP te IST sistem (Tendera i sur., 2006).

2.3.5.3. Mikrovalna pražnjenja

Sve plazme koje su stvorene injektiranjem mikrovalne snage tj. elektromagnetske radijacije u rasponu frekvencije od 300 MHz do 10 GHz, se u principu mogu zvati mikrovalno inducirane plazme (eng. microwave induced plasmas, MIPs). Ovo je u stvari samo opći naziv grupe plazmi koja se sastoji od nekoliko različitih plazma tipova. Ti različiti tipovi MIP plazme mogu raditi pri širokom rasponu uvjeta tj. tlaku od manje od 0,1 Pa do nekoliko atmosfera, snage između nekoliko W i nekoliko stotina kW i to sve se može održati i u atmosferi plemenitih i molekularnih plinova (Bogaerts i sur., 2002).

2.4. TEKUĆINSKA PLAZMA

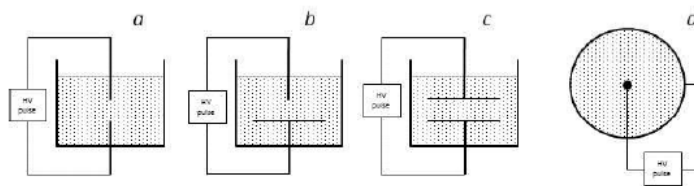
Prema prethodno navedenim činjenicama, samo je nekoliko konfiguracija pogodnih za stvaranje pražnjenja i stabilnog tretiranja u tekućoj fazi. Zajedničko tim konfiguracijama je pojačanje primijenjenog električnog polja kako bi se postigao visoki električni intenzitet dovoljan za raspad pražnjenja. U plinskoj fazi, zahtijevan je električni intenzitet od oko 30 kV/cm kod atmosferskog tlaka. Zbog prethodno spomenutih faktora, raspad tekućina događa se ako je električni intenzitet od 1 MV cm^{-1} dosegnut. Postoje konfiguracije koje kombiniraju pražnjenje plazme u plinskoj kao i u tekućoj fazi i to su tzv. hibridni sistemi. Najčešći hibridni reaktori koriste igla na ploču elektrodnu geometriju kod koje je igla smještena iznad, a elektrodna ploča ispod površine vode. Kod drugog hibridnog reaktora baziranog na DBD-u, pražnjenje se stvara iznad površine vode pri čemu ono pluta na površini elektrode. Postoje i posebni sistemi koji koriste pjenušavu okolinu ili okolinu sa mjehurićima.

Pražnjenja u tekućoj fazi mogu biti provedena primjenom DC ili AC visoke voltaže. DC voltaža može biti primijenjena u obliku pulseva visoke voltaže ili u kontinuiranom obliku. Kod AC voltaže, visoko frekventni (eng. high frequency, HF) režim kao i drugi režimi iznad 50 Hz mogu biti upotrijebljeni. Što se tiče tekuće faze, ugl. su voda i vodene otopine izučavane u svrhu stvaranja pražnjenja i utvrđivanja njegove primjene. Raspad pražnjenjem u nekoliko različitih tekućina kao što su ulje, glicerin ili ugljikovodici su također istraženi (Kozakova, 2013).

2.4.1. Konfiguracija elektroda

Imamo nekoliko različitih konfiguracija elektroda koje se primjenjuju za stvaranje električnog pražnjenja u tekućinama, a to su vrh-na-vrh, vrh-na-ploču, ploča-na-ploču te žičani cilindar geometrije koje možemo vidjeti na slici 5. Najčešće upotrebljavana konfiguracija za stvaranje električnog pražnjenja kroz direktnu ionizaciju tekućina je visoko asimetrična geometrija vrh-na-ploču. Tako stvoreni električni izboj je klasično koronarno pražnjenje. U ovoj konfiguraciji vrh se uobičajeno koristi kao visoko voltažna elektroda kako bi koncentrirala električno polje za pražnjenje u tekućoj fazi. Početak elektrodnog pražnjenja kod ove konfiguracije je određen amplitudom primijenjenog voltažnog pulsa te polumjerom zakrivljenosti vrha. Ova konfiguracija i konfiguracija vrh-na-vrh se teško mogu primijeniti u komercijalne svrhe zbog ograničene trajnosti vrha elektrode koji je kratak zbog njenog

razaranja tijekom pražnjenja. Električno pražnjenje dobiveno na ovaj način zauzima mali volumen (Gasanova, 2013).



Slika 5. Osnovne konfiguracije elektroda: a) vrh-na-vrh, b) vrh-na-ploču, c) ploča-na-ploču, d) žičani cilindar (Gasanova, 2013)

2.5. PRIMJENA HLADNE PLAZME U PREHRAMBENOJ INDUSTRIJI

Netermalna plazma potencijalna je metoda koja se sve više primjenjuje u prehrambenoj industriji uključujući i suhu dezinfekciju površine hrane (mesa, piletine i puretine, ribe i svježih povrtnih proizvoda), granula i čestica hrane (sušenog mlijeka, biljaka i začina) te prokljalih sjemenki. Song i sur. (2009) su u svom radu zaključili da inaktivacijski učinci atmosferske plinske plazme na *L. monocytogenes* značajno ovise o vrsti hrane o kojoj je riječ. U radu Fernandez i Thompsona (2012) pokazana je uspješna primjena hladne atmosferske plazme u inaktivaciji *Salmonella* stanica. Ova tehnologija je također uspješno primijenjena za površinsku sterilizaciju ambalažnih materijala, ali i za njihovu funkcionalnu modifikaciju kako bi imala željena svojstva. Yun i sur. (2010) su u svom radu pokazali da je atmosferska plinska plazma efikasna u inaktivaciji *L. monocytogenes* i primjenjiva na jednokratnim spremnicima za hranu. Kroz zadnjih nekoliko godina sakupio se niz podataka o utjecaju netermalne plazme na inaktivaciju mikroorganizama na površinama abiotskih materijala kao što su sintetske membrane i staklo. Neke od važnijih primjena su u: tretmanu sirovih i sušenih proizvoda, kontroli biofilmova i dekontaminaciji procesiranih površina, površinskoj dekontaminaciji jaja, sterilizaciji ambalažnog materijala, tretmanu otpadne vode (Misra i sur., 2011).

Niskotlačna radio frekvencijska plazma proizvedena u vakuum komori se intenzivno koristi u osnovnom procesiranju kao npr. za deponiranje i graviranje u poluvodičkoj industriji još od 1970-ih godina. Od 1990-ih primjena atmosferske hladne plazme eliminirala je potrebu za skupim vakuum komorama i sistemima pumpi. Kao takve, atmosferske hladne plazme,

imaju široku ekološku primjenu, koriste se za modifikaciju površine raznih materijala, u biomedicinske svrhe i brojne druge (Chu i Lu, 2014).

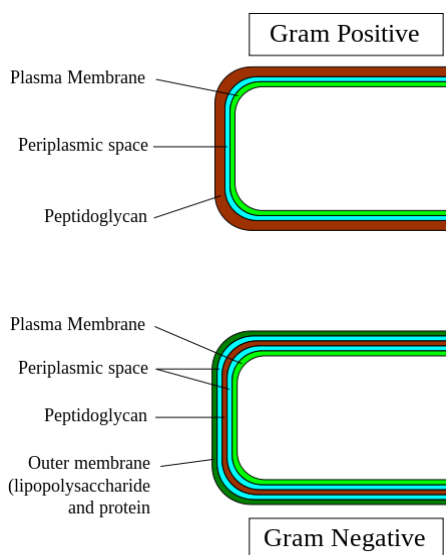
2.6. *ESCHERICHIA COLI*

Carstvo bakterija je ekstremno raznolika grupa mikroorganizama te se može naći u bilo kojem dijelu ekosustava gdje je prisutna tekuća voda. Postoji preko 5000 prepoznatih i priznatih vrsta bakterija, koje se međusobno razlikuju na temelju strukturnih i biokemijskih karakteristika. No, sve one dijele osnovnu staničnu organizaciju. Većina istraživanja bakterija se bazira na nekolicini dobro istraženih organizama, npr. kada je riječ o gram-negativnim bakterijama *Escherichia coli* te *Salmonella* vrste, a kada je riječ o gram-pozitivnim bakterijama dominiraju istraživanja *Bacillus*, *Clostridium*, *Streptococcus* i *Staphylococcus* vrsta.

Prokariotske stanice imaju male sličnosti sa eukariotskim stanicama. Prokariotske stanice ne sadrže organele vezane na membrane te njihov genetski materijal nije nikad organiziran u kompleksne strukture kao što su kromosomi kao i brojne druge organele. Bakterijske stanice se sastoje od važnih makromolekularnih struktura. Omotač koji zatvara stanicu sadrži seriju kompleksnih struktura: membranu stanice, staničnu stjenku, a ponekad kada je riječ o gram-negativnim organizmima i vanjsku membranu. Kod određenih organizama također postoji i dobro-definirana regija između vanjske membrane i citoplazmatske membrane koja se naziva periplazma. Unutrašnjost stanica, citosol ili citoplazma, gusto je popunjena ribosomima i regijom nukleusa. Također se kod određenih stanica mogu pronaći i drugi primjetni dijelovi koji se uglavnom povezuju sa skladišnom funkcijom.

Stanična stjenka gram-pozitivnih bakterija se sastoji od debljeg sloja mureina ili peptidoglikana u koji su ugrađene teihoična i teihuronična kiselina. Ti slojevi su naslagani jedan na drugi te omataju stanicu čime tvore egzoskelet. On također definira i oblik stanice. Osim što je stanična stjenka mehanički vrlo snažna (toleriraju hipotonične otopine), njena površina se može ponašati kao snažan ion-izmjenjivački ili kelacijski sistem za izdvajanje iona iz okoline. Gram-pozitivne bakterije su osjetljive na lizozime koji oštećuju njihovu stjenku do mjere da se rasprsnu u hipotoničnom okruženju.

Stanična stjenka gram-negativnih bakterija je kompleksnija od stjenke gram-pozitivnih jer su razvile različiti način obrane membrane, što se vidi na slici 6. Njihova stjenka sadrži relativno male količine mureina u tankom sloju okruženog vanjskom membranom. Ta vanjska membrana se kemijski razlikuje od stanične membrane jer je kemijski otporna i visoko asimetrična. Dvoslojna struktura na unutrašnjoj strani je vrlo slična normalnoj staničnoj membrani, ali strana vanjske membrane koja je okrenuta prema van je sačinjena od jedinstvenog materijala, lipopolisaharida, lipoproteina i fosfolipida. Jedno od jedinstvenih svojstava lipopolisaharida je sposobnost da uklone hidrofobne komponente. Vanjska membrana gram-negativnih bakterija predstavlja efikasnu barijeru i za hidrofobne i hidrofilne materijale. Kako bi omogućili prolaz željenim nisko-molekularnim spojevima kroz membranu, ona sadrži nekoliko proteina u membrani koji omogućuju pasivnu difuziju, ali ima i određene specifične proteinske molekule koje provode translokaciju pojedinih sastojaka. Vanjska membrana je čvrsto vezana za ostatak stanice kovalentnim vezama preko lipoproteina u vanjskim membranama, te slabijim, nekovalentnim vezama između vanjske membrane i proteina stanične stjenke i proteina stanične membrane (Lovit i Wright, 2014). U radu *Ziuzine i sur. (2014)* pokazana je veća osjetljivost gram negativnih bakterija (*E. coli*) na atmosfersku hladnu plazmu.



Slika 6. Usporedba stanične stjenke gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija (Wikipedia, 2008)

Escherichia coli, gram–negativna bakterija je dio obitelji *Enterobacteriaceae* i roda *Escherichia*. Ona je ne-sporogena bakterija te fakultativni anaerob. Stanice *E. coli* su štapičaste i pokretne, a optimalna temperatura joj je 37°C. Ona može rasti pri pH 4.4, a dobro rasti u mediju sa gotovo neutralnim pH vrijednostima i aktivitetom vode (a_w) 0,95. *E. coli* se

smatra uzročnikom otrovanja povezanih sa različitim vrstama hrane kao što je sirovo mlijeko, vrhnje, pite, pire krumpir, povrće, pljesnivi sir, nekuhano ili nedovoljno kuhano meso ili piletina. Nekoliko je sojeva *E. coli* koji su se pokazali kao snažni patogeni koji se prenose hranom, a O157:H7 je najopasniji za ljude jer je uzročnik nekoliko smrtnih slučajeva svake godine (Patel i sur., 2014).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Test mikroorganizam i njegovo čuvanje

Proučavana je inaktivacija bakterije *Escherichia coli* MG1655 koja je pribavljena iz banke mikrobioloških kultura Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta (Zagreb, Hrvatska).

Escherichia coli MG1655 čuva se pri +4°C na Nutrient agaru (Biolife, Milan, Italija). Kako bi se kultura očuvala precjepljivala se svaka 2 tjedna na pripremljeni agar. Agar se pripremao prema uputama proizvođača.

3.1.2. Hranjive podloge

Hranjivi agar

SASTAV: 8 g dehidrirane podloge, 1L destilirane vode, 12 g agara.

PRIPREMA:

Za 1 L hranjivog agara (Biolife, Milan, Italija) odvagalo se 8 g dehidrirane podloge. Dehidrirana podloga otopila se u destiliranoj vodi. Kako bi se podloga održala u čvrstoj fazi pri temperaturi inkubacije od 30-37 °C u 1 L pripremljene podloge dodalo se približno 12 g agara na 1 L podloge. Podloga se sterilizirala u autoklavu ("Sutjeska", model 200-189) 15 min pri 121 °C. Podloge su sterilno razlivene u pripremljene Petrijeve zdjelice u laminaru (Klimaoprema, model KTV-A) u struji zraka i uz otvoren plamenik, kako ne bi došlo do naknadne kontaminacije sterilizirane tekuće podloge. Razlivene podloge uz poluotvorene poklopce sušile su se u struji zraka u laminaru.

Pripremljeni hranjivi agar čuvao se pri +4 °C kroz 3 mjeseca. Hranjivi agar služi za pripremu i uzgoj čistih kultura odabranih mikroorganizama.

3.1.3. Kemikalije

Indikator listić (Quantofix Peroxyde 25, Macherey-Nagel Germany)

PBS-fosfatni pufer

SASTAV: natrijev klorid (NaCl), kalijev klorid (KCl), natrijev hidrogenfosfat dihidrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$), kalijev dihidrogenfosfat (KH_2PO_4), destilirana voda, klorovodična kiselina (HCl).

PRIPREMA: Izvagalo se 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,62 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ i 0,24 g KH_2PO_4 u 900 mL destilirane vode. Sa HCl se podesio pH na 7,4 te se nadopunio do 1000 mL destiliranom vodom. Pripremljena otopina autoklavirala se pri 121 °C kroz 15 min. Autoklavirana otopina čuva se pri +4 °C kroz 3 mjeseca.

Titan reagens

SASTAV: titan (IV) oksid, sumporna kiselina (1:1), destilirana voda

PRIPREMA: Titan test reagens se izradio otapanjem 1g titanij praha tj. titan (IV) oksida (Sigma Aldrich, CAS: 13463-67-7) u 100 mL vruće sumporne kiseline (1:1). Reakcijska smjesa se zatim zagrijavala na oko 190°C i miješala kroz 20h. Titanij je otopljen kada inicijalno bijela otopina postane prozirna (može se dodati destilirane vode tijekom zagrijavanja ako se uoči značajan gubitak vode). Nakon što se sav titanij otopio, reagens otopina se hladila na sobnu temperaturu i razrijedila na volumen od 500 mL destiliranom vodom. Reagens otopina se zatim skladištila na hladnom mjestu.

3.1.4. Oprema i uređaji

Centrifuga (Hettich, Rotofix 32), Autoklav (“Sutjeska”, model 200-189), Laminar (Klimooprema, model KTV-A), Vorteks (IKA, Vortex 4 basic; BV), Termostat (“Bodalec i Bodalec”, model EBT), Spektrofotometar (SECOMAM UviLine 9400 Spectrophotometer, Secomam Groupe Aqualabo, France), pH metar (340i/SET, WTW, Njemačka), Pulsni visokonaponski generator (Spellman, UK), naponska sonda (Tektronix P6015A,), osciloskop (Hantek DS05202BM,), konduktometar (Hanna Instruments).

3.1.5. Izvor plinske plazme

Za generiranje plazme korišten je pulsni visokonaponski generator (Spellman, UK) (slika 7). Strujni krug se sastoji se od visokonaponskog napajanja, 2 elektrolitska kondenzatora kapaciteta 0,75 nF, serijski spojenih otpornika od ukupno 9,5 M Ω , rotirajuće sklopke tzv. „spark – gap“ komore spojene na elektromotor s regulatorom frekvencije, te kontrolne jedinice napajanja (Slika 10.). Napon je mjeran naponskom sondom Tektronix P6015A spojenom na osciloskop Hantek DS05202BM. Korišten je reaktor volumena 1000 ml, zatvoren s gumenim čepom s prilagođenim otvorom za elektrodu uzemljenja. Konfiguracija elektroda u reaktoru bila je postavljena u obliku točka-ploča, odnosno s igličnom visokonaponskom elektrodom (igla od titana), te pločastom elektrodom uzemljenja od nehrđajućeg čelika promjera 4,5 cm.



Slika 7. Sustav za generiranje plazme u tekućini visokonaponskim pražnjenjem: A) reaktor, B) pumpe, C) visokonaponski generator D) kontrolna jedinica za napajanje, E) otpornici 9,5 M Ω F) kondenzator 0,75 nF G) rotirajuća sklopka, H) elektromotor s regulatorom frekvencije.

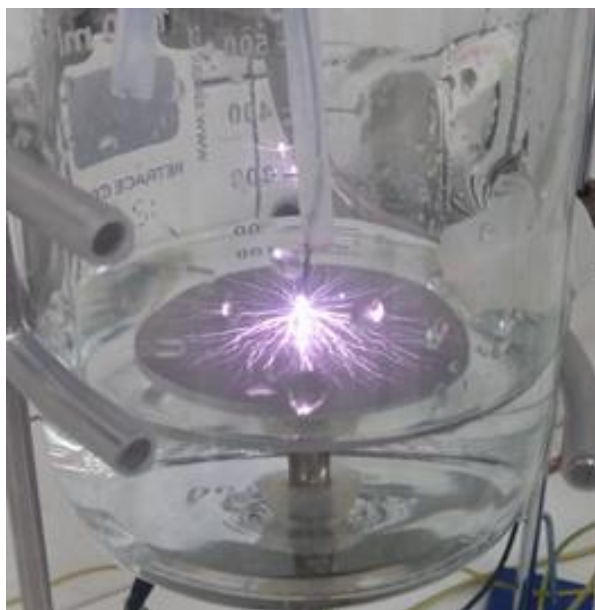
3.2. METODE

3.2.1. Priprema uzorka

20 μL suspenzije mikrobne kulture *Escherichia coli* MG1655, pripremljene u 50% glicerola i čuvane pri temperaturi od -20°C , precijepilo se aseptično u struji zraka u laminaru (Klimaoprema, model KTV-A) u 10 mL nutrient bujona. Da bi se postigao očekivani rast mikrobne kulture, plastična epruveta s nacijepljenim bujonom inkubirala se u termostatu (“Bodalec i Bodalec”, model EBT) pri $37^{\circ}\text{C}/24\text{h}$. Nakon 24h mikrobna kultura je centrifugirana (Hettich, Rotofix 32) pri 4000 RPM/10 min. Nakon centrifugiranja supernatant je odliven, a na biomasu bakterije je nadodan sterilni fosfatni pufer (10 mL). Uzorak se protresao na vorteksu (IKA, Vortex 4 basic; BV) te se postupak odlijevanja sterilnog fosfatnog pufera/destilirane vode, centrifugiranja i ponovnog vorteksiranja ponavljao 3x. 10 mL uzorka se prije tretmana miješalo sa 190 mL destilirane vode kojoj se električna provodljivost prethodno namjestila na 100 ili 800 $\mu\text{S cm}^{-1}$. Ona se namjestila postepenim dodavanjem natrijevog nitrata do očitavanja željene električne provodljivosti na direktno uronjenom konduktometru.

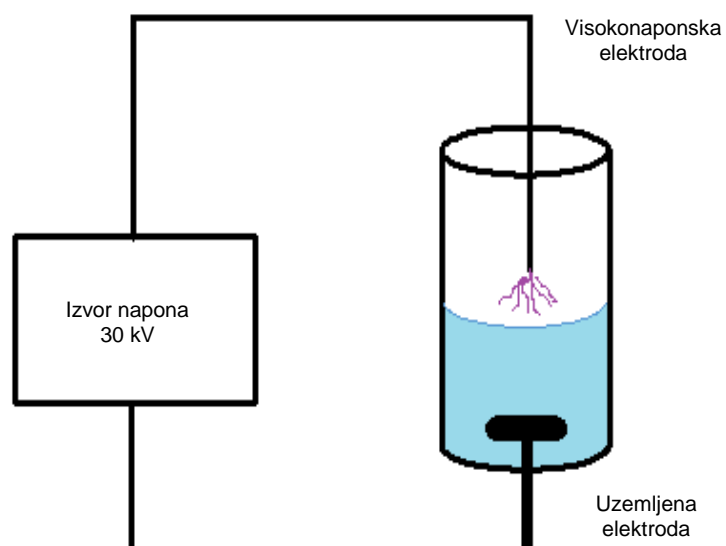
3.2.2. Obrada uzoraka plinskom plazmom

Dobivene suspenzije čiste kulture (200 mL) sa početnim brojem stanica 10^7 - 10^8 CFU mL^{-1} tretirane su hladnom plazmom kao što je prikazano na slici 8. Prije i nakon tretmana mjerila se električna provodljivost, pH i temperatura. Ovisno o tretmanu u reaktor se propuštao plemeniti plin argon čistoće 99,99 %. Tretirano je 48 uzoraka sa 5 varijabilnih parametara. Prvi je vrijeme tretiranja koje je bilo 5 i 10 min, drugi frekvencija i to od 60, 90 i 120 Hz, treći električna provodljivost koja je bila 100 μS i 800 μS , četvrti je polaritet (+ ili -), a peti je plin (argon ili zrak). Prije i nakon tretmana hladnom plazmom provedene su analize određivanja istjecanja unutarstaničnog sadržaja, stvaranja biofilma, koncentracija slobodnih radikala te postotak rekuperacije stanica nakon tretiranja.

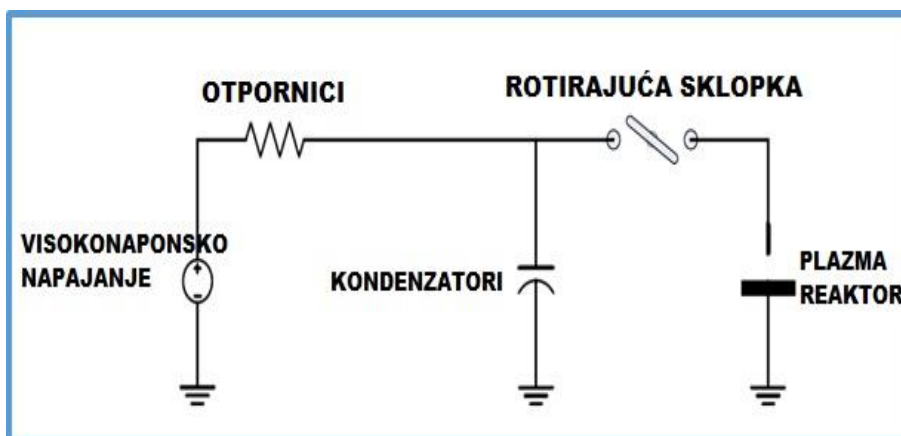


Slika 8. Električno pražnjenje u suspenziji čiste kulture Escherichia coli MG1655

Kao što je vidljivo sa slike 9. kod pražnjenja u plinskoj fazi visokonaponska elektroda nalazi se iznad razine tekućine, a uzemljena elektroda nalazi se u tekućoj fazi. Na slici 10. vidimo shematski prikaz strujnog kruga u sistemu za tretiranje hladnom plazmom.



Slika 9. Shematski prikaz pražnjenja u plinskoj fazi



Slika 10. Shematski prikaz strujnog kruga

3.2.3. Metoda brojenja poraslih kolonija

Početni broj nacijepio se u seriji decimalnih razrjeđenja (do 10^{-6}) i to u omjeru 1:9 (uzorak:PBS). Svaki uzorak nacijepio se u triplicatu. Uzorci su nacijepljeni prije i nakon tretiranja na Nutrient agar. Nacijepljene ploče inkubirale su se pri 37°C kroz 24 h.

Nakon nacijepeljivanja i brojanja poraslih kolonija odredio se broj živih stanica nakon 24 h prema formuli:

$$CFU = \frac{\text{broj poraslih kolonija}}{\text{upotrebljeni volumen uzorka}} \times \text{recipročna vrijednost decimalnog razrjeđenja} \quad (1)$$

Broj kolonija odredio se prema gore navedenoj formuli (1) gdje su se u obzir uzele samo one ploče koje su imale broj poraslih kolonija od 30 - 300 (Reynolds, 2011).

3.2.4. Biofilm

Escherichia coli MG1655 uzgojena je aerobno na hranjivom agru pri 37°C . Iz porasle bakterijske kulture koja je inkubirana 24h, izradila su se razrjeđenja s otprilike 10^8 bakterijskih stanica/mL i to prije i nakon tretmana hladnom plazmom. Razrjeđenja su zatim nacijepljivana u jažice multiwell ploča, na način da se svaki uzorak u količini od 200 μl dodao u po dvije jažice. Za svaki biofilm eksperiment izradile su se i kontrolne jažice u koje nije

dodavan uzorak. Nakon 4h inkubacije, tijekom koje dolazi do adhezije stanica za podlogu, uklanjanje supernatant iz jažica te su one isprane sa po 100 μ L PBS-a. Zatim su dodana 2 mL svježeg medija tj. nutrient bujona u svaku jažicu. Nakon toga multwell ploče su ponovno stavljene na inkubaciju kroz 24h kako bi se stvorio biofilm.

Nakon 24h inkubacije provedena je kvantifikaciju biofilma kristal violet testom. Najprije se uklonio supernatant iz jažica, a zatim su se ispirale PBS-om. Kako bi fiksirali biofilm dodana su 2 mL 99%-tnog metanola koji je ostavljan da djeluje kroz 15min. Nakon 15 min metanol se uklonio, jažice se posušile te se dodao 2 mL kristal violet boje kroz 20 min. Nakon 20 min uklonila se boja i jažice su se ispirale destiliranom vodom. Kako bi odvojili sve stanice sa površine dodala su se 2 mL 33%-tne octene kiseline u svaku jažicu, uzorci su izuzeti iz jažica i zatim im se mjerila apsorbancija pri 590 nm (Peeters i sur., 2008).

3.2.5. Rekuperacija

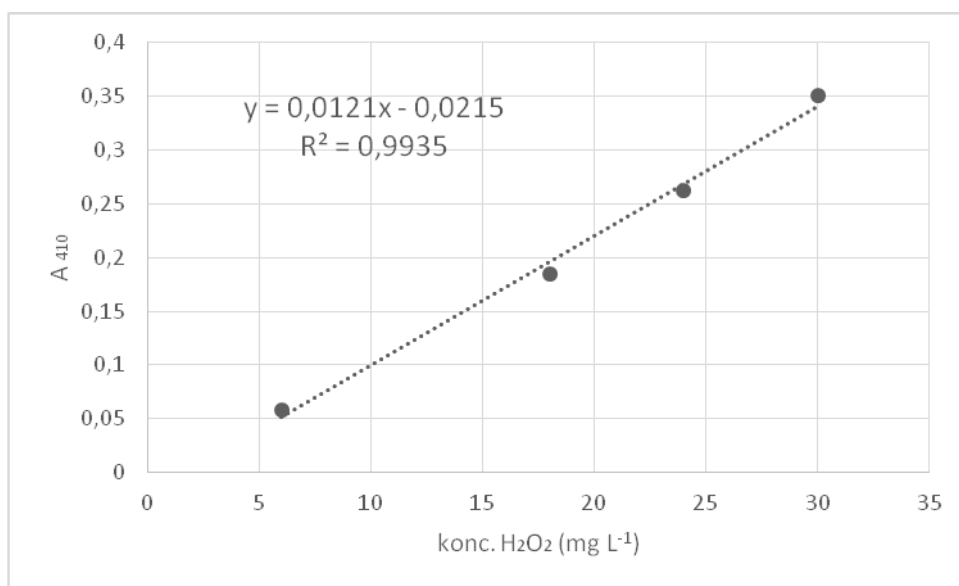
Čista kultura *E. coli* MG1655 nakon tretmana uzgajala se u puferiranoj peptonskoj vodi (Biolife, Milan, Italija) na 30°C kroz 18 h. Postotak bakterijske rekuperacije procijenio se na temelju broja kolonija naraslih na mediju za uzgoj te se prikazao u odnosu na broj bakterija koji je u ušao ovaj postupak.

3.2.6. Istjecanje staničnog sadržaja

Na svakom uzorku izuzetom prije i tijekom tretiranja (5 i 10 min) utvrdilo se istjecanje staničnog sadržaja soja *E. coli* MG1655. Alikvot od 3 mL stanične kulture izložene djelovanju hladne plazme filtrirao se kroz CHROMAFIL Xtra PTFE-20/25 filter (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Duren, Germany) sa 0.25 μ m veličinom pora. U dobivenom filtratu bez stanica utvrdila se prisutnost nukleinskih kiselina i proteina mjerenjem apsorbancije pri 260 nm i 280 nm (Prieto-Calvo i sur., 2014).

3.2.7. Određivanje koncentracije slobodnih radikala

Nakon tretmana plazmom odredila se koncentracija vodikovog peroksida u uzorku i to UV-Vis spektroskopijom pri 410 nm. 1 mL pripremljenog titan reagensa (Sigma Aldrich, CAS: 13463-67-7) pomiješao se sa 2 mL uzorka te se preko izrađenog baždarnog pravca vidljivog na slici 11. očitala koncentracija vodikovog peroksida. Vodikov peroksid nakon tretmana odredio se i preko indikator listića (Quantofix Peroxyde 25, Macherey-Nagel Germany).



Slika 11. Baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije o koncentraciji H_2O_2

3.2.8. Obrada podataka

Kako bi se odredio utjecaj raznih parametara na učinkovitost tretmana korišteni su centralni složeni dizajn (central composite design, CCD; STATGRAPHICS Centurion, StatPoint Technologies) i površinski centrirani model (Kuehl, 2000.). Kao operativni parametri za CCD odabrani su vrijeme tretmana, plin, temperatura uzorka, frekvencija, električna provodljivost te polaritet.

Provedena je analiza varijance (ANOVA) kako bi se mogla utvrditi odstupanja ($p < 0,05$) u provedenim tretmanima. Operativne varijable su promatrane na 3 nivoa tj. niskom (-1), centralnom (0) i visokom (1). Provedeno je 48 eksperimenata organiziranih u faktorski plan

(uključujući faktorske točke, osovinske točke i centralne točke), a preostali eksperiment je uključio ponavljanje centralne točke kako bi dobili dobru procjenu eksperimentalne pogreške. Izlazne vrijednosti su log CFU/mL, postotak rekuperacije, biofilm, apsorbancija pri 260 i 280 nm, koncentracija slobodnih radikala (tj. H₂O₂) te temperatura.

Plan je bio baziran na punom faktorskom planu na dvije razine i poduprt centralnim i vršnim točkama (Myers i Montgomery, 2002). Ukupni broj eksperimenata (N) je računat po sljedećoj jednadžbi:

$$N=N_i+N_0+N_j$$

gdje je $N_i=2n$ broj eksperimenata da punim faktorskim planom na dvije razine, N_0 je broj centralnih točaka, a $N_j=2*n$ je broj vršnih točaka.

Eksperimentalni rezultati su analizirani responzivnom površinskom metodom (RSM) koristeći program STATGRAPHICS Centurion. RSM se koristio za proučavanje 5 različitih parametra; A - plin, B - električna provodljivost, C - polaritet, D - frekvencija i E - vrijeme tretmana. Kako bi se optimizirao tretman atmosferskom plinskom plazmom i istražio utjecaj pet nezavisnih varijabli na inaktivaciju *E. coli* MG1655, uspostavljen je centralni složeni rotirajući dizajn gdje su se varijable koristile na 5 razina (Khuri i Cornell, 1996).

Modelu je dodana višestruka linearna regresija (multiple linear regression – MLR). Točnost kvadratnog empirijskog modela provjerena je analizom varijance (ANOVA) sa razinom pouzdanosti od 95%. Također je provedena Durbin-Watsonova statistička analiza, što je omogućilo autokorelaciju i predviđanje pogrešaka nakon što je regresijska analiza završena. Rezultati Durbin-Watsonove analize su uvijek između 0 i 4. Pri vrijednosti 2 znači da ne postoji korelacija u uzorku, približavanjem vrijednosti 0 označava se pozitivna korelacija, a približavanjem vrijednosti 4 označava se negativna korelacija.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. REZULTATI

Tablica 1. Parametri plinske plazme i rezultati inaktivacije plinskom plazmom

Uzorak	Vrijeme (min)	Električna provodljivost (μS)	Polaritet	Frekvencija (Hz)	Plin	Log CFU ml^{-1}	A (260 nm)	A (280 nm)	% rekuperacije	Biofilm	H ₂ O ₂ (mgL ⁻¹)	Promjena temperature (°C)
1	10	100	-	90	Argon	4,16	0,048	0,091	46,37	0,327	16,73	9,9
2	10	800	+	60	Argon	0,86	0,01	0,026	93,32	0,045	5,40	8,9
3	5	800	-	60	Argon	0,67	0,015	0,022	97,77	0,034	3,90	4,8
4	10	800	-	60	Argon	1,01	0,049	0,056	103,48	0,098	7,10	8,1
5	5	800	-	120	Zrak	0,23	0,004	-0,002	92,36	0,060	2,30	11,3
6	10	800	+	90	Argon	1,92	0,038	0,097	70,79	0,152	9,63	7,9
7	10	100	+	60	Argon	5,14	0,044	0,054	33,25	0,129	14,80	7,7
8	10	100	+	60	Zrak	2,68	0,016	0,030	69,79	0,112	12,80	6,6
9	10	100	+	120	Zrak	3,11	0,047	0,061	57,99	0,148	18,10	10,8
10	5	800	+	90	Argon	0,95	0,038	0,049	84,17	0,095	6,80	5,4
11	5	100	-	120	Argon	2,92	0,007	0,015	61,70	0,142	4,87	3,2
12	5	800	-	120	Argon	0,78	0,021	0,027	90,74	0,045	3,70	6,1
13	10	100	+	120	Argon	0,70	0,009	0,111	73,17	0,186	17,10	11,8
14	5	800	-	90	Argon	1,34	0,037	0,042	78,65	0,095	8,90	7,4
15	10	100	-	60	Argon	4,99	0,075	0,126	39,47	0,519	18,00	9,4
16	5	100	+	90	Argon	4,63	0,014	0,032	39,13	0,131	15,40	4,2
17	5	100	+	60	Argon	2,48	0,015	0,015	66,22	0,054	7,30	3,8
18	5	800	-	60	Zrak	0,60	0,009	0,037	83,47	0,107	4,20	2,4
19	5	100	+	90	Zrak	1,81	0,021	0,048	75,24	0,102	7,40	5,2
20	10	800	+	120	Argon	1,11	0,018	0,042	81,01	0,096	6,50	10,8
21	10	100	-	120	Zrak	2,43	0,022	0,047	75,29	0,178	10,70	11,1

Uzorak	Vrijeme (min)	Električna provodljivost (μS)	Polaritet	Frekvencija (Hz)	Plin	Log CFU ml^{-1}	A (260 nm)	A (280 nm)	% rekuperacije	Biofilm	H ₂ O ₂ (mgL ⁻¹)	Promjena temperature (°C)
22	10	100	+	90	Argon	7,80	0,026	0,053	100	0,360	22,50	11,6
23	5	800	+	120	Argon	0,77	0,015	0,029	81,77	0,069	4,20	5,1
24	10	800	-	120	Argon	1,98	0,026	0,047	77,07	0,102	8,90	10,8
25	5	100	+	120	Zrak	1,56	0,019	0,042	77,89	0,097	6,70	5,3
26	5	800	+	60	Zrak	0,50	0,008	0,088	100	0,121	2,40	4
27	5	800	+	90	Zrak	0,20	0,010	0,009	79,75	0,131	3,80	3,9
28	10	100	-	90	Zrak	2,10	0,025	0,046	71,91	0,145	8,60	7,5
29	5	100	-	120	Zrak	1,74	0,015	0,031	80,90	0,103	6,90	5,6
30	10	800	+	60	Zrak	0,68	0,015	0,009	65,17	0,233	6,00	5,1
31	10	800	-	90	Zrak	1,00	0,024	0,030	72,48	0,286	6,00	7,6
32	10	800	+	90	Zrak	0,90	0,0157	0,012	68,29	0,209	8,20	7,8
33	10	100	-	120	Argon	2,21	0,016	0,030	68,97	0,741	10,99	11,4
34	10	800	-	120	Zrak	0,77	0,010	0,014	71,19	0,116	5,00	11,3
35	10	100	+	90	Zrak	2,45	0,024	0,056	69,24	0,187	11,40	7,9
36	5	100	+	60	Zrak	0,86	0,014	0,039	87,38	0,112	7,40	3,6
37	10	100	-	60	Zrak	1,93	0,021	0,048	74,31	0,134	6,90	8,6
38	10	800	+	120	Zrak	0,50	0,009	0,011	75,61	0,186	6,10	11,8
39	5	100	+	120	Argon	2,92	0,02	0,045	64,35	0,142	11,40	5,5
40	5	100	-	60	Argon	2,49	0,015	0,575	71,34	0,487	2,30	5
41	5	800	+	120	Zrak	0,50	0,030	0,040	72,94	0,139	2,90	7,1
42	5	800	-	90	Zrak	0,86	0,015	0,03	77,76	0,212	4,10	3,5
43	10	800	-	60	Zrak	0,77	0,010	0,014	71,19	0,479	18,00	3,5
44	5	100	-	60	Zrak	0,92	0,025	0,041	89,66	0,153	3,10	3,2
45	5	100	-	90	Argon	2,46	0,060	0,078	68,13	0,134	11,70	5
46	5	100	-	90	Zrak	1,04	0,034	0,051	80,17	0,213	8,70	6,1
47	10	800	-	90	Argon	1,93	0,024	0,048	71,76	0,286	10,10	11,2
48	5	800	+	60	Argon	0,57	0,024	0,025	93,08	0,046	3,40	3,5

Tablica 2. Procijenjeni učinci primjenjenog plina, električne provodljivosti, polariteta, frekvencije i vremena na broj stanica log CFUmL⁻¹, promjenu temperature, slobodne radikale, biofilm, istjecanje sadržaja i rekuperaciju stanica E.coli

Rezultati	Učinci	Procjena svih učinaka	Standardna pogreška
Log CFUmL ⁻¹	prosjeak	2,2218800	0,23583500
	A: plin	1,1104200	0,27231900
	B: električna provodljivost	-1,8387500	0,27231900
	C: polaritet	-0,1779170	0,27231900
	D: frekvencija	-0,1825000	0,33352100
	E: vrijeme	0,8054170	0,27231900
	AB	-0,5787500	0,27231900
	AC	-0,0645833	0,27231900
	AD	-0,4200000	0,33352100
	AE	0,0970833	0,27231900
	BC	0,3845830	0,27231900
	BD	0,3050000	0,33352100
	BE	-0,3504170	0,27231900
	CD	0,1425000	0,33352100
	CE	-0,0362500	0,27231900
	DD	-1,2325000	0,57767500
	DE	-0,4737500	0,33352100
Temperatura	prosjeak	7,0062500	0,32493700
	A: plin	0,7375000	0,37520500
	B: električna provodljivost	-0,0291667	0,37520500
	C: polaritet	0,3625000	0,37520500
	D: frekvencija	3,1750000	0,45953100
	E: vrijeme	4,1208300	0,37520500
	AB	0,1541670	0,37520500
	AC	0,1458330	0,37520500
	AD	-1,4875000	0,45953100
	AE	0,9208330	0,37520500

Rezultati	Učinci	Procjena svih učinaka	Standardna pogreška
	BC	0,1958330	0,37520500
	BD	1,0750000	0,45953100
	BE	-0,7625000	0,37520500
	CD	0,0500000	0,45953100
	CE	-0,2208330	0,37520500
	DD	0,1875000	0,79593100
	DE	0,8125000	0,45953100
Slobodni radikali	prosjeak	9,9975000	0,75585900
	A: plin	2,2466700	0,87279000
	B: električna provodljivost	-4,7608300	0,87279000
	C: polaritet	-1,0808300	0,87279000
	D: frekvencija	0,2100000	1,06895000
	E: vrijeme	5,0741700	0,87279000
	AB	-1,4525000	0,87279000
	AC	-0,3558330	0,87279000
	AD	0,4725000	1,06895000
	AE	0,2491670	0,87279000
	BC	2,4866700	0,87279000
	BD	-1,5600000	1,06895000
	BE	-1,2133300	0,87279000
	CD	-1,4775000	1,06895000
	CE	0,1216670	0,87279000
	DD	-4,4100000	1,85147000
	DE	-0,9112500	1,06895000
Biofilm	prosjeak	0,1915620	0,02733150
	A: plin	0,0230000	0,03155970
	B: električna provodljivost	-0,0664167	0,03155970
	C: polaritet	0,0797500	0,03155970
	D: frekvencija	-0,0195625	0,03865260
	E: vrijeme	0,1012500	0,03155970

Rezultati	Učinci	Procjena svih učinaka	Standardna pogreška
	AB	-0,1160000	0,03155970
	AC	0,0456667	0,03155970
	AD	0,0334375	0,03865260
	AE	0,0293333	0,03155970
	BC	-0,0465833	0,03155970
	BD	-0,0241875	0,03865260
	BE	-0,0067500	0,03155970
	CD	-0,0459375	0,03865260
	CE	0,0342500	0,03155970
	DD	-0,0448125	0,06694830
	DE	0,0200625	0,03865260
Istjecanje sadržaja pri 260 nm	prosjek	0,0482500	0,01906750
	A: plin	0,0376250	0,02201720
	B: električna provodljivost	-0,0401250	0,02201720
	C: polaritet	0,0217083	0,02201720
	D: frekvencija	-0,0384375	0,02696550
	E: vrijeme	-0,0103750	0,02201720
	AB	-0,0194583	0,02201720
	AC	0,0265417	0,02201720
	AD	-0,0306875	0,02696550
	AE	-0,0040417	0,02201720
	BC	-0,0277083	0,02201720
	BD	0,0298125	0,02696550
	BE	0,0112083	0,02201720
	CD	-0,0503125	0,02696550
	CE	-0,0187917	0,02201720
	DD	0,0156875	0,04670560
	DE	0,0384375	0,02696550
Istjecanje sadržaja pri 280 nm	prosjek	0,0283563	0,00304117
	A: plin	0,0092208	0,00351164

Rezultati	Učinci	Procjena svih učinaka	Standardna pogreška
	B: električna provodljivost	-0,0065542	0,00351164
	C: polaritet	0,0044708	0,00351164
	D: frekvencija	-0,0048125	0,00430086
	E: vrijeme	0,0056958	0,00351164
	AB	0,0037208	0,00351164
	AC	0,0056958	0,00351164
	AD	-0,0095625	0,00430086
	AE	0,0028042	0,00351164
	BC	-0,0033625	0,00351164
	BD	0,0039375	0,00430086
	BE	-0,0038042	0,00351164
	CD	-0,0074375	0,00430086
	CE	0,0020542	0,00351164
	DD	-0,0159000	0,00744931
	DE	-0,0055625	0,00430086
Rekuperacija	prosjek	0,0283563	0,00304117
	A: plin	0,0092208	0,00351164
	B: električna provodljivost	-0,0065542	0,00351164
	C: polaritet	0,0044708	0,00351164
	D: frekvencija	-0,0048125	0,00430086
	E: vrijeme	0,0056958	0,00351164
	AB	0,0037208	0,00351164
	AC	0,0056958	0,00351164
	AD	-0,0095625	0,00430086
	AE	0,0028042	0,00351164
	BC	-0,0033625	0,00351164
	BD	0,0039375	0,00430086
	BE	-0,0038042	0,00351164
	CD	-0,0074375	0,00430086
	CE	0,0020542	0,00351164

Rezultati	Učinci	Procjena svih učinaka	Standardna pogreška
	DD	-0,0159000	0,00744931
	DE	-0,0055625	0,00430086

Tablica 3. Analiza varijance parametara plinske plazme (plin, električna provodljivost, polaritet, frekvencija, vrijeme) i njihovih interakcija

Rezultat	Učinci	Suma kvadrata	Stupnjevi slobode	Srednje odstupanje	F-omjer	P-vrijednost
Log CFU/mL	A - plin	14,7963000	1	14,79630000	16,63	0,0003
	B – električna provodljivost	40,5720000	1	40,57200000	45,59	0,0000
	C - polaritet	0,3798520	1	0,37985200	0,43	0,5184
	D - frekvencija	0,2664500	1	0,26645000	0,30	0,5882
	E - vrijeme	7,7843500	1	7,78435000	8,75	0,0059
	AB	4,0194200	1	4,01942000	4,52	0,0416
	AC	0,0500521	1	0,05005210	0,06	0,8141
	AD	1,4112000	1	1,41120000	1,59	0,2173
	AE	0,1131020	1	0,11310200	0,13	0,7239
	BC	1,7748500	1	1,77485000	1,99	0,1678
	BD	0,7442000	1	0,74420000	0,84	0,3675
	BE	1,4735000	1	1,47350000	1,66	0,2077
	CD	0,1624500	1	0,16245000	0,18	0,6721
	CE	0,0157687	1	0,01576870	0,02	0,8950
	DD	4,0508200	1	4,05082000	4,55	0,0409
	DE	1,7955100	1	1,79551000	2,02	0,1655
	Ukupna pogreška	27,5866000	31	0,88989000		
	Ukupna (korelacija)	106,9960000	47			
Temperatura	A - plin	6,5268700	1	6,52687000	3,86	0,0584

Rezultat	Učinci	Suma kvadrata	Stupnjevi slobode	Srednje odstupanje	F-omjer	P-vrijednost
	B - električna provodljivost	0,0102083	1	0,01020830	0,01	0,9385
	C - polaritet	1,5768800	1	1,57688000	0,93	0,3415
	D - frekvencija	80,6450000	1	80,64500000	47,74	0,0000
	E - vrijeme	203,7750000	1	203,77500000	120,62	0,0000
	AB	0,2852080	1	0,28520800	0,17	0,6840
	AC	0,2552080	1	0,25520800	0,15	0,7002
	AD	17,7012000	1	17,70120000	10,48	0,0029
	AE	10,1752000	1	10,17520000	6,02	0,0199
	BC	0,4602080	1	0,46020800	0,27	0,6054
	BD	9,2450000	1	9,24500000	5,47	0,0259
	BE	6,9768700	1	6,97687000	4,13	0,0508
	CD	0,0200000	1	0,02000000	0,01	0,9141
	CE	0,5852080	1	0,58520800	0,35	0,5604
	DD	0,0937500	1	0,09375000	0,06	0,8153
	DE	5,2812500	1	5,28125000	3,13	0,0869
	Ukupna pogreška	52,369800	31	1,68935000		
	Ukupna (korelacija)	395,9830000	47			
Slobodni radikali	A - plin	60,5701000	1	60,57010000	6,63	0,0151
	B - električna provodljivost	271,9860000	1	271,98600000	29,75	0,0000
	C - polaritet	14,0184000	1	14,01840000	1,53	0,2249
	D - frekvencija	0,3528000	1	0,35280000	0,04	0,8455
	E - vrijeme	308,9660000	1	308,96600000	33,80	0,0000
	AB	25,3171000	1	25,31710000	2,77	0,1061
	AC	1,5194100	1	1,51941000	0,17	0,6863
	AD	1,7860500	1	1,78605000	0,20	0,6615
	AE	0,7450080	1	0,74500800	0,08	0,7772
	BC	74,2021000	1	74,20210000	8,12	0,0077
	BD	19,4688000	1	19,46880000	2,13	0,1545
	BE	17,6661000	1	17,66610000	1,93	0,1744

Rezultat	Učinci	Suma kvadrata	Stupnjevi slobode	Srednje odstupanje	F-omjer	P-vrijednost
	CD	17,4640000	1	17,46400000	1,91	0,1768
	CE	0,1776330	1	0,17763300	0,02	0,8900
	DD	51,8616000	1	51,86160000	5,67	0,0235
	DE	6,6430100	1	6,64301000	0,73	0,4005
	Ukupna pogreška	283,3760000	31	9,14116000		
	Ukupna (korelacija)	1156,1200000	47			
Biofilm	A - plin	0,0063480	1	0,00634800	0,53	0,4716
	B - električna provodljivost	0,0529341	1	0,05293410	4,43	0,0435
	C - polaritet	0,0763207	1	0,07632070	6,39	0,0168
	D - frekvencija	0,0030615	1	0,00306153	0,26	0,6164
	E - vrijeme	0,1230190	1	0,12301900	10,29	0,0031
	AB	0,1614720	1	0,16147200	13,51	0,0009
	AC	0,0250253	1	0,02502530	2,09	0,1579
	AD	0,0089445	1	0,00894453	0,75	0,3936
	AE	0,0103253	1	0,01032530	0,86	0,3598
	BC	0,0260401	1	0,02604010	2,18	0,1500
	BD	0,0046803	1	0,00468028	0,39	0,5360
	BE	0,0005468	1	0,00054675	0,05	0,8320
	CD	0,0168820	1	0,01688200	1,41	0,2437
	CE	0,0140768	1	0,01407680	1,18	0,2862
	DD	0,0053551	1	0,00535509	0,45	0,5082
	DE	0,0032201	1	0,00322003	0,27	0,6074
	Ukupna pogreška	0,3705180	31	0,01195220		
	Ukupna (korelacija)	0,9087690	47			
Istjecanje sadržaja pri 260nm	A - plin	0,0169877	1	0,01698770	2,92	0,0975
	B - električna provodljivost	0,0193202	1	0,01932020	3,32	0,0780
	C - polaritet	0,0056550	1	0,00565502	0,97	0,3318
	D - frekvencija	0,0118195	1	0,01181950	2,03	0,1640
	E - vrijeme	0,0012917	1	0,00129169	0,22	0,6408

Rezultat	Učinci	Suma kvadrata	Stupnjevi slobode	Srednje odstupanje	F-omjer	P-vrijednost
	AB	0,0045435	1	0,00454352	0,78	0,3836
	AC	0,0084535	1	0,00845352	1,45	0,2371
	AD	0,0075338	1	0,00753378	1,30	0,2638
	AE	0,0001960	1	0,00019602	0,03	0,8555
	BC	0,0092130	1	0,00921302	1,58	0,2176
	BD	0,0071103	1	0,00711028	1,22	0,2774
	BE	0,0015075	1	0,00150752	0,26	0,6143
	CD	0,0202508	1	0,02025080	3,48	0,0716
	CE	0,0042375	1	0,00423752	0,73	0,3999
	DD	0,0006563	1	0,00065626	0,11	0,7392
	DE	0,0118195	1	0,01181950	2,03	0,1640
	Ukupna pogreška	0,1803300	31	0,00581710		
	Ukupna (korelacija)	0,3109260	47			
Istjecanje sadržaja pri 280nm	A - plin	0,0010203	1	0,00102029	6,89	0,0133
	B - električna provodljivost	0,0005155	1	0,00051549	3,48	0,0715
	C - polaritet	0,0002399	1	0,00023986	1,62	0,2124
	D - frekvencija	0,0001853	1	0,00018528	1,25	0,2718
	E - vrijeme	0,0003893	1	0,00038931	2,63	0,1149
	AB	0,0001661	1	0,00016614	1,12	0,2975
	AC	0,0003893	1	0,00038931	2,63	0,1149
	AD	0,0007315	1	0,00073153	4,94	0,0336
	AE	0,0000944	1	0,00009436	0,64	0,4306
	BC	0,0001357	1	0,00013568	0,92	0,3457
	BD	0,0001240	1	0,00012403	0,84	0,3670
	BE	0,0001737	1	0,00017366	1,17	0,2870
	CD	0,0004425	1	0,00044253	2,99	0,0937
	CE	0,0000506	1	0,00005065	0,34	0,5628
	DD	0,0006742	1	0,00067416	4,56	0,0408
	DE	0,0002475	1	0,00024753	1,67	0,2054

Rezultat	Učinci	Suma kvadrata	Stupnjevi slobode	Srednje odstupanje	F-omjer	P-vrijednost
	Ukupna pogreška	0,0045874	31	0,00014798		
	Ukupna (korelacija)	0,0101671	47			
Rekuperacija	A - plin	4,8450500	1	4,84505000	5,06	0,0318
	B - električna provodljivost	23,6181000	1	23,61810000	24,66	0,0000
	C - polaritet	2,7027500	1	2,70275000	2,82	0,1030
	D - frekvencija	0,1800000	1	0,18000000	0,19	0,6676
	E - vrijeme	13,4726000	1	13,47260000	14,07	0,0007
	AB	20,8692000	1	20,86920000	21,79	0,0001
	AC	0,3692520	1	0,36925200	0,39	0,5392
	AD	0,2664500	1	0,26645000	0,28	0,6016
	AE	0,0315188	1	0,03151880	0,03	0,8572
	BC	1,3433500	1	1,34335000	1,40	0,2453
	BD	1,9701100	1	1,97011000	2,06	0,1615
	BE	0,6510020	1	0,65100200	0,68	0,4160
	CD	0,0351125	1	0,03511250	0,04	0,8494
	CE	0,1912690	1	0,19126900	0,20	0,6581
	DD	7,5937500	1	7,59375000	7,93	0,0084
	DE	2,2578100	1	2,25781000	2,36	0,1348
	Ukupna pogreška	29,6923000	31	0,95781500		
	Ukupna (korelacija)	110,0900000	47			

Tablica 4. Polinomi, optimalne vrijednosti i optimalni faktori za rezultate log CFUmL⁻¹, temperaturu, slobodne radikale, biofilm, istjecanje staničnog sadržaja pri 260 i 280 nm te rekuperaciju

Rezultati				
Log CFUmL ⁻¹	Polinom	$n = -6,24452 + 2,88786A - 0,00215476B - 0,926548C + 0,141985D + 0,523274E - 0,00165357AB - 0,129167AC - 0,014AD + 0,0388333AE + 0,00109881BC + 0,0000145238BD - 0,000200238BE + 0,00475CD - 0,0145CE - 0,000684722(D^2) - 0,00315833DE$		
	Optimalna vrijednost	5,17892		
	Optimalni faktori	Faktor	Najniže	Najviše
		Plin	0,0	1,0
		Električna provodljivost	100,0	800,0
		Polaritet (+ je 0, a - je	0,0	1,0
		Frekvencija	60,0	120,0
		Vrijeme	5,0	10,0
Temperatura	Polinom	$n = -0,174405 + 2,09345A - 0,00188095B + 0,477381C - 0,00553571D + 0,392738E + 0,000440476AB + 0,291667AC - 0,0495833AD + 0,368333AE + 0,000559524BC + 0,0000511905BD - 0,000435714BE + 0,00166667CD - 0,0883333CE + 0,000104167(D^2) + 0,00541667DE$		
	Optimalna vrijednost	2,66667		
	Optimalni faktori	Faktor	Najniže	Najviše
		Plin	0,0	1,0
		Električna provodljivost	100,0	800,0
		Polaritet (+ je 0, a - je	0,0	1,0
		Frekvencija	60,0	120,0
		Vrijeme	5,0	10,0
Slobodni radikali	Polinom	$n = -5,2097 + 2,305A + 0,00360714B + 0,145357C + 0,540241D + 1,79942E - 0,00415AB - 0,711667AC + 0,01575AD + 0,0996667AE + 0,00710476BC - 0,0000742857BD - 0,000693333BE - 0,04925CD + 0,0486667CE - 0,00245(D^2) - 0,006075DE$		
	Optimalna vrijednost	2,10604		

Rezultati					
	Optimalni faktori	<i>Faktor</i>	<i>Najniže</i>	<i>Najviše</i>	<i>Optimalno</i>
		<i>Plin</i>	0,0	1,0	0,0
		<i>Električna provodljivost</i>	100,0	800,0	800,0
		<i>Polaritet (+ je 0, a - je</i>	0,0	1,0	0,0
		<i>Frekvencija</i>	60,0	120,0	60,0
		<i>Vrijeme</i>	5,0	10,0	5,0
Biofilm	Polinom	$n = -0,115747 - 0,0618363A + 0,00026997B + 0,129039C + 0,00387872D - 0,00276845E - 0,000331429AB + 0,0913333AC + 0,00111458AD + 0,0117333AE - 0,000133095BC - 0,00000115179BD - 0,00000385714BE - 0,00153125CD + 0,0137CE - 0,0000248958(D^2) + 0,00013375DE$			
	Optimalna vrijednost	-0,00254167			
	Optimalni faktori	<i>Faktor</i>	<i>Najniže</i>	<i>Najviše</i>	<i>Optimalno</i>
		<i>Plin</i>	0,0	1,0	1,0
		<i>Električna provodljivost</i>	100,0	800,0	800,0
		<i>Polaritet (+ je 0, a - je</i>	0,0	1,0	0,0
		<i>Frekvencija</i>	60,0	120,0	60,0
		<i>Vrijeme</i>	5,0	10,0	5,0
Istjecanje sadržaja pri 260 nm	Polinom	$n = 0,26747 + 0,140289A - 0,000165744B + 0,238104C - 0,00342009D - 0,023453E - 0,0000555952AB + 0,0530833AC - 0,00102292AC - 0,00161667AE - 0,0000791667BC + 0,00000141964 BD + 0,00000640476BE - 0,00167708CD - 0,00751667CE + 0,00000871528(D)^2 + 0,00025625DE$			
	Optimalna vrijednost	-0,258729			
	Optimalni faktori	<i>Faktor</i>	<i>Najniže</i>	<i>Najviše</i>	<i>Optimalno</i>
		<i>Plin</i>	0,0	1,0	1,0
		<i>Električna provodljivost</i>	100,0	800,0	100,0
		<i>Polaritet (+ je 0, a - je 1)</i>	0,0	1,0	1,0
		<i>Frekvencija</i>	60,0	120,0	60,0
		<i>Vrijeme</i>	5,0	10,0	5,0

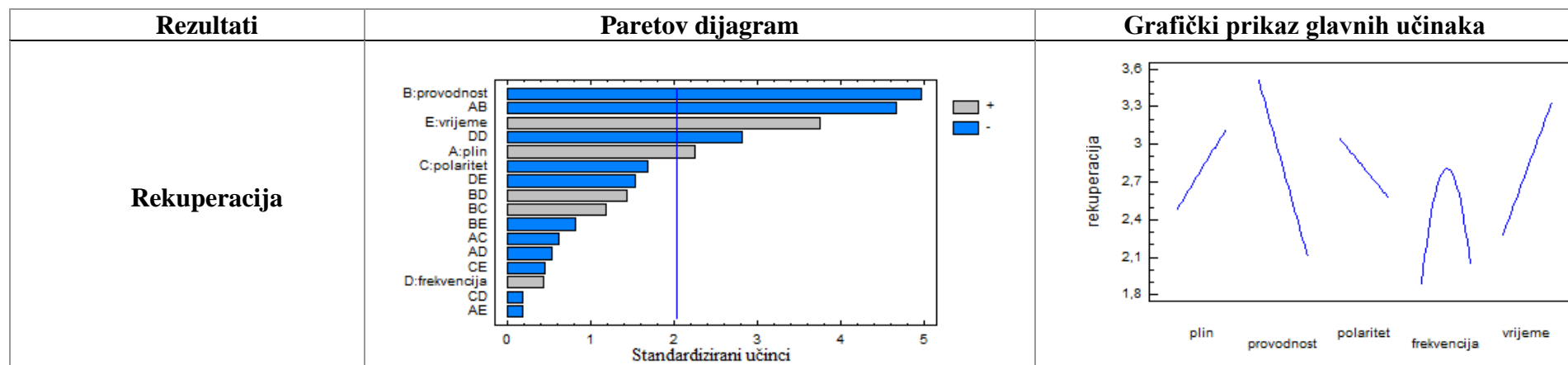
Rezultati				
Istjecanje sadržaja pri 280 nm	Polinom	$n = -0,0870595 + 0,0190161A - 0,0000104464B + 0,0192482C + 0,00198687D + 0,00448321E + 0,000010631AB + 0,0113917AC - 0,00031875AC + 0,00112167AE - 0,00000960714BC + 1,875E-7BD - 0,00000217381BE - 0,000247917CD + 0,000821667CE - 0,00000883333(D)^2 - 0,0000370833DE$		
	Optimalna vrijednost	0,0560352		
	Optimalni faktori	<i>Faktor</i>	<i>Najniže</i>	<i>Najviše</i>
		<i>Plin</i>	0,0	1,0
		<i>Električna provodljivost</i>	100,0	800,0
		<i>Polaritet (+ je 0, a - je 1)</i>	0,0	1,0
		<i>Frekvencija</i>	60,0	120,0
		<i>Vrijeme</i>	5,0	10,0
Rekuperacija	Polinom	$n = -9,02357 + 3,20762A - 0,00172679B - 0,151845C + 0,191324D + 0,62606E - 0,00376786AB - 0,350833AC - 0,00608333AC - 0,0205AE + 0,000955952BC + 0,000023631BD - 0,000133095BE - 0,00220833CD - 0,0505CE - 0,0009375(D)^2 - 0,00354167DE$		
	Optimalna vrijednost	-0,0279167		
	Optimalni faktori	<i>Faktor</i>	<i>Najniže</i>	<i>Najviše</i>
		<i>Plin</i>	0,0	1,0
		<i>Električna provodljivost</i>	100,0	800,0
		<i>Polaritet (+ je 0, a - je 1)</i>	0,0	1,0
		<i>Frekvencija</i>	60,0	120,0
		<i>Vrijeme</i>	5,0	10,0

Gdje je A = plin (zrak ili argon), B = električna provodljivost (μS), C = polaritet (+ ili -), D = frekvencija (Hz), a E = vrijeme (min).

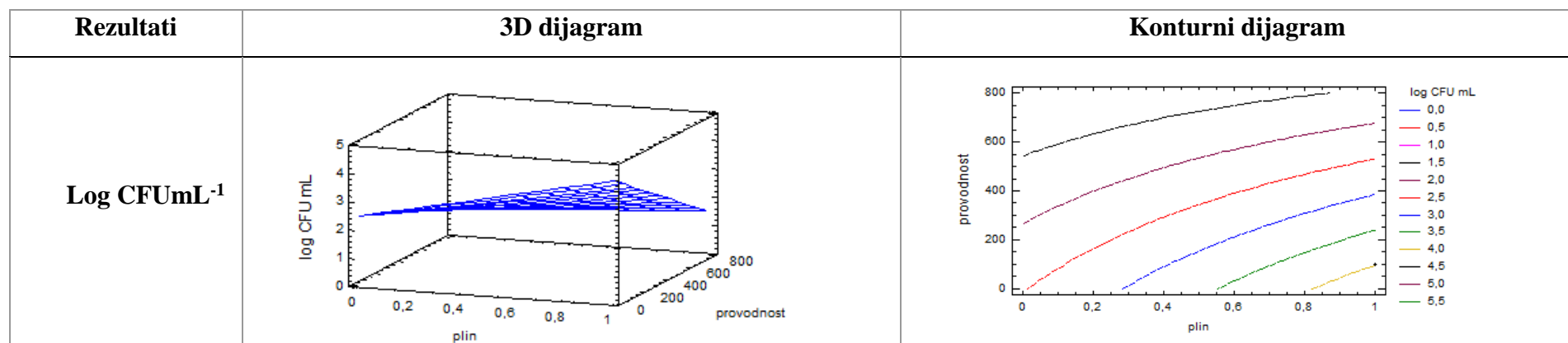
Tablica 5. Standardizirani Pareto dijagram i grafički prikaz glavnih učinaka na svaki od rezultata

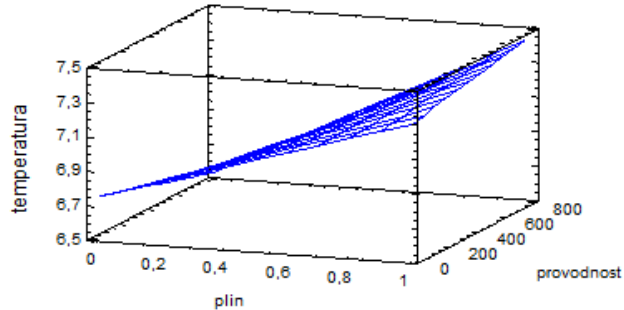
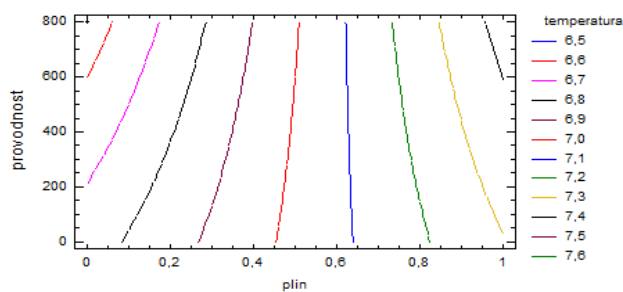
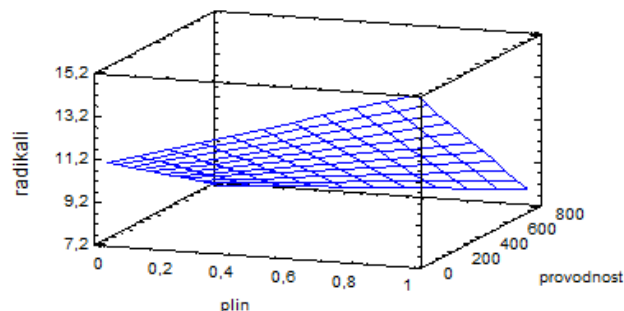
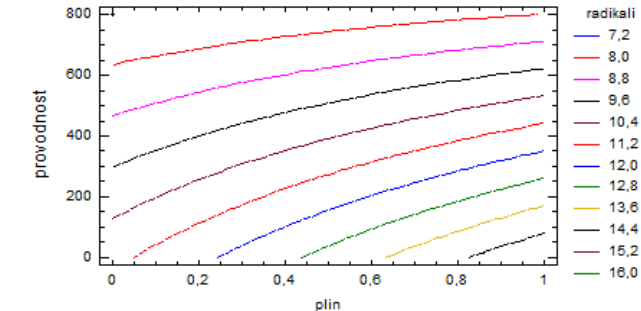
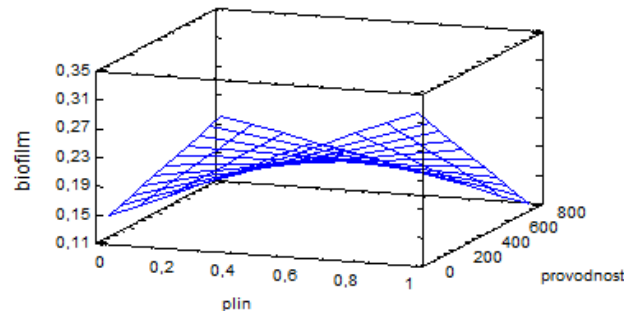
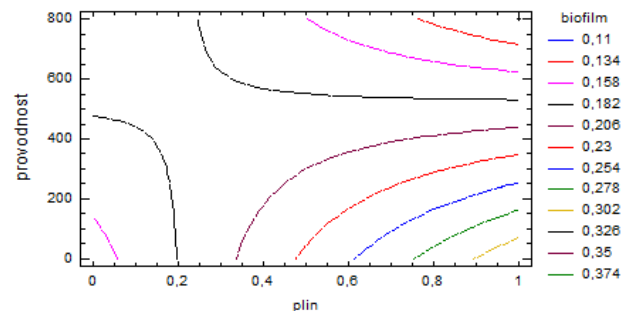
Rezultati	Pareto dijagram	Grafički prikaz glavnih učinaka
Log CFUmL ⁻¹		
Temperatura		
Slobodni radikali		

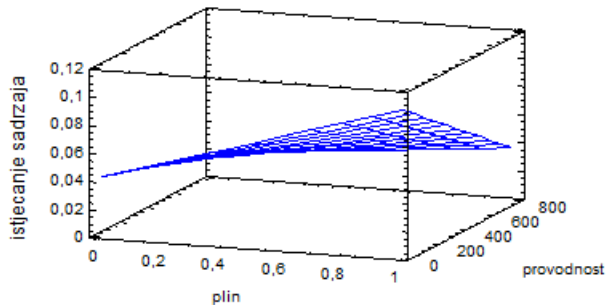
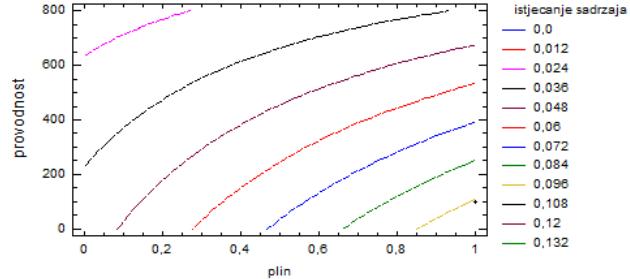
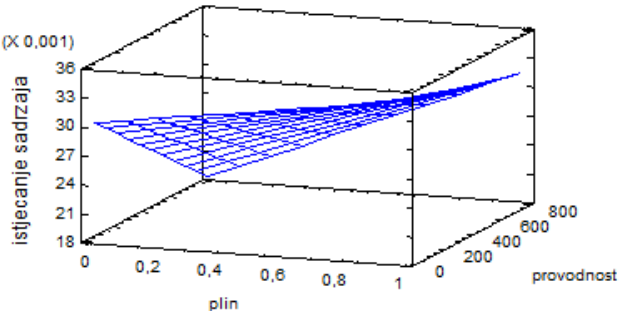
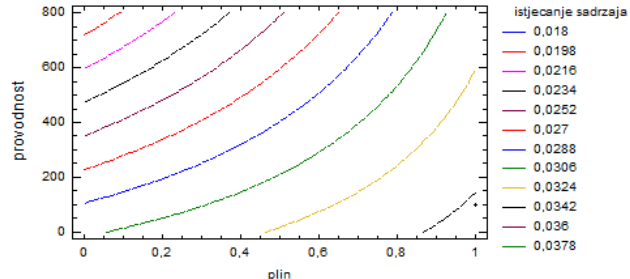
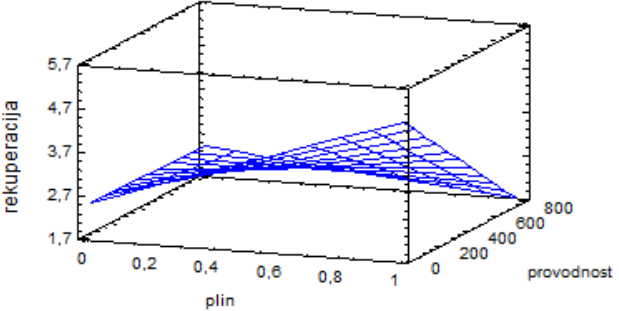
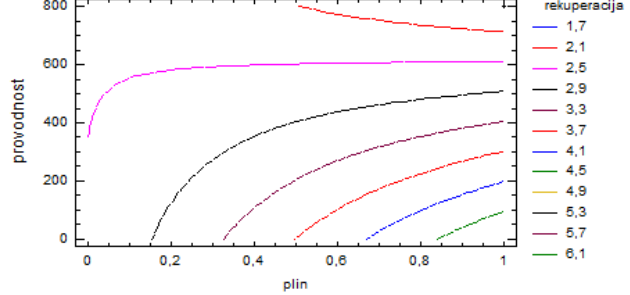
Rezultati	Paretov dijagram	Grafički prikaz glavnih učinaka
Biofilm		
Istjecanje sadržaja pri 260 nm		
Istjecanje sadržaja pri 280 nm		



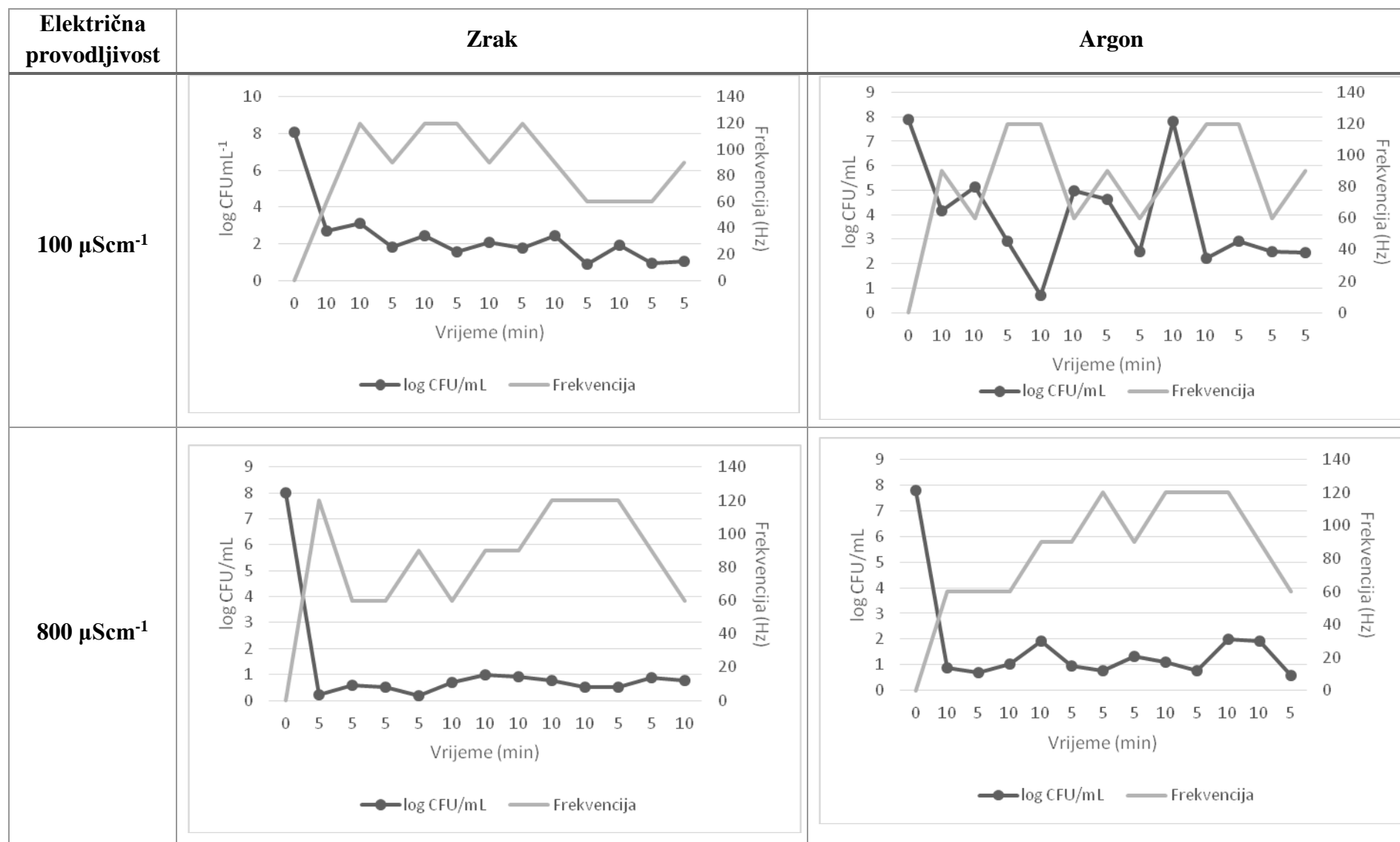
Tablica 6. 3D i konturni dijagrami za svaki od rezultata



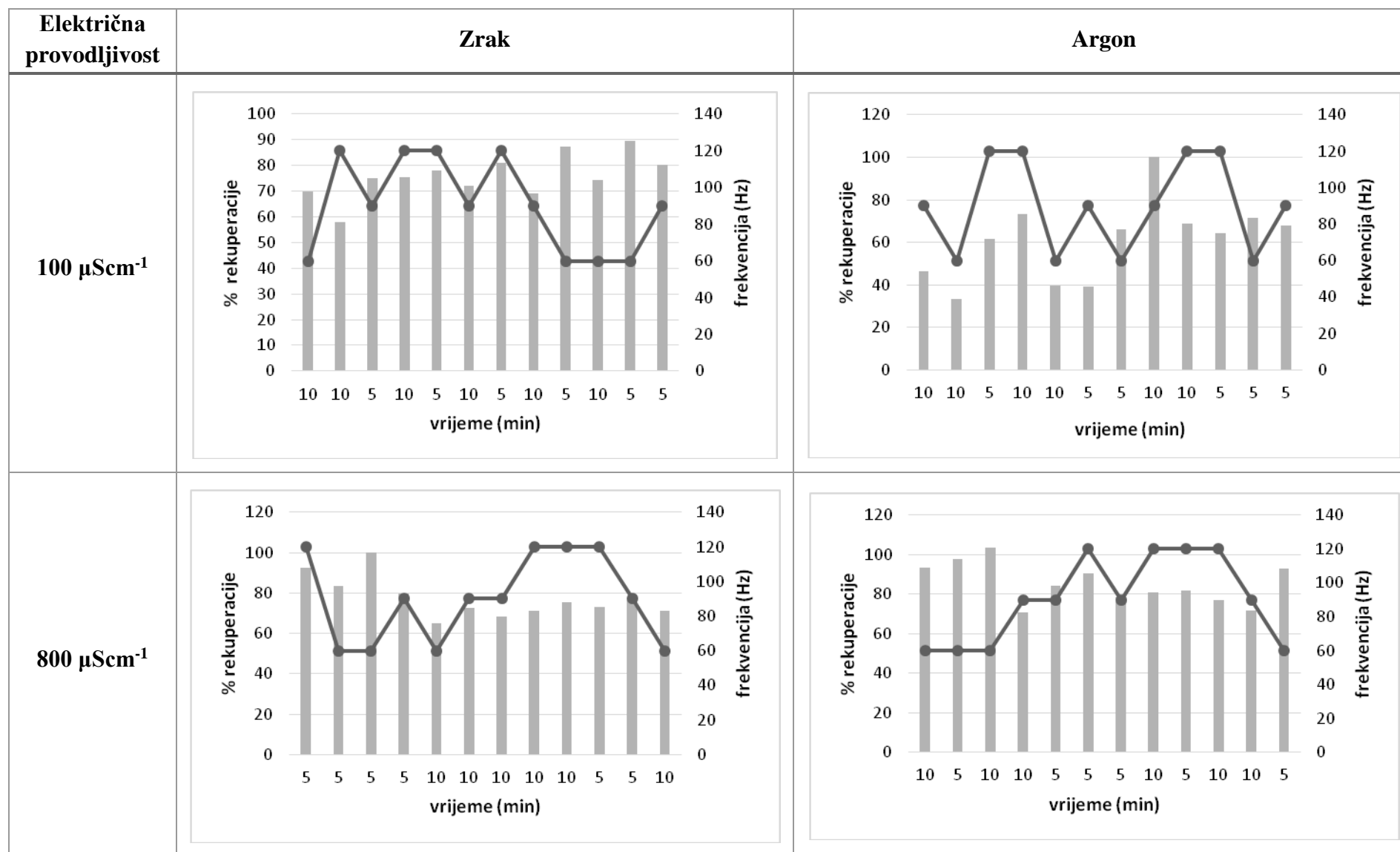
Rezultati	3D dijagram	Konturni dijagram
Temperatura		
Slobodni radikali		
Biofilm		

Rezultati	3D dijagram	Konturni dijagram
Istjecanje sadržaja pri 260nm		
Istjecanje sadržaja pri 280nm		
Rekuperacija		

Tablica 7. Grafički prikazi ovisnosti $\log \text{CFU mL}^{-1}$ (redukcije broja stanica) o vremenu i frekvenciji



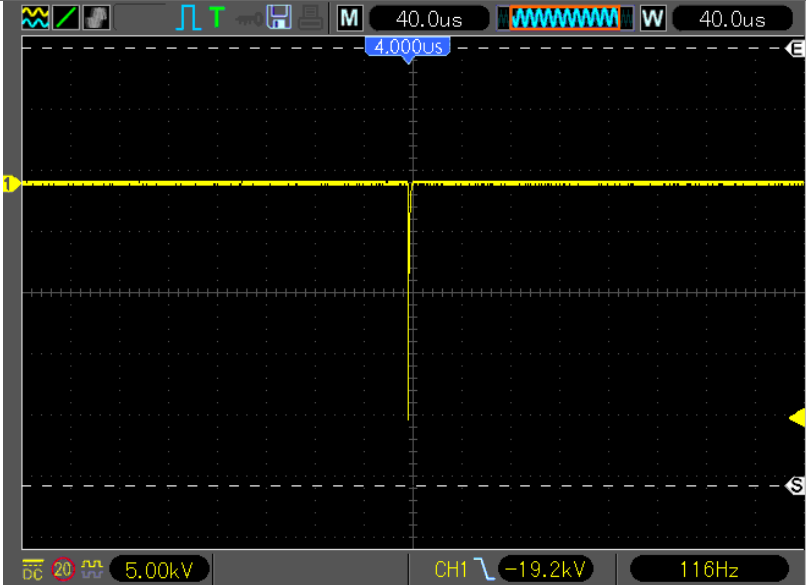
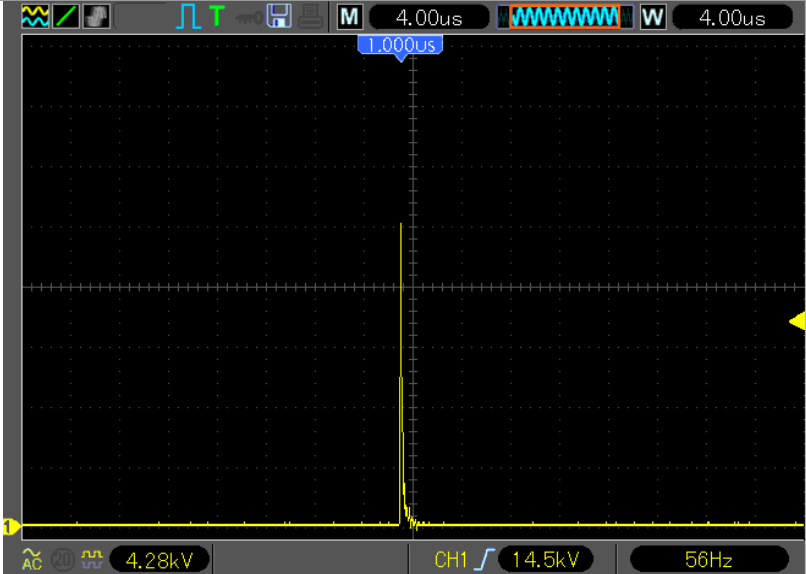
Tablica 8. Grafički prikazi ovisnosti postotka rekuperacije o vremenu i frekvenciji



Tablica 9. Statistički parametri regresije i analize

	Rezultati	Parametar
Koeficijent determinacije, R^2 (%)	log CFU/mL	74,2173
	Temperatura	86,7747
	Slobodni radikali	75,4891
	Biofilm	59,2286
	Istjecanje sadržaja pri 260 nm	42,0022
	Istjecanje sadržaja pri 280 nm	54,8806
	Rekuperacija	73,029
Prilagođeni koeficijent determinacije (za stupnjeve slobode) (%)	log CFU/mL	60,9101
	Temperatura	79,9488
	Slobodni radikali	62,8383
	Biofilm	38,1853
	Istjecanje sadržaja pri 260 nm	12,0679
	Istjecanje sadržaja pri 280 nm	31,5931
	Rekuperacija	59,1085
Standardna pogreška procjene	log CFU/mL	0,94334
	Temperatura	1,29975
	Slobodni radikali	3,02343
	Biofilm	0,109326
	Istjecanje sadržaja pri 260 nm	0,0762699
	Istjecanje sadržaja pri 280 nm	0,0121647
	Rekuperacija	0,97868
Srednje apsolutno odstupanje	log CFU/mL	0,48783
	Temperatura	0,817795
	Slobodni radikali	1,89208
	Biofilm	0,0661875
	Istjecanje sadržaja pri 260 nm	0,0368837
	Istjecanje sadržaja pri 280 nm	0,00795295
	Rekuperacija	0,586059
Durbin-Watsonova statistika	log CFU/mL	1,81729 (P = 0,2449)
	Temperatura	1,76067 (P = 0,1849)
	Slobodni radikali	2,03069 (P = 0,5324)
	Biofilm	2,08495 (P = 0,6092)
	Istjecanje sadržaja pri 260 nm	1,83352 (P = 0,2638)
	Istjecanje sadržaja pri 280 nm	2,07044 (P = 0,5890)
	Rekuperacija	1,89579 (P = 0,3424)
Lag 1 rezidual autokorekcija	log CFU/mL	0,0910923
	Temperatura	0,11623
	Slobodni radikali	- 0,0189411
	Biofilm	-0,0717502
	Istjecanje sadržaja pri 260 nm	0,0812537
	Istjecanje sadržaja pri 280 nm	-0,0397032
	Rekuperacija	0,0484394

Tablica 10. Grafički prikaz naponskog vala tijekom tretmana plinskom plazmom

Polaritet	Naponski val
Negativni	 <p>S/R setup</p> <p>Storage</p> <p>Local Memory</p> <p>USB Flash</p> <p>Location</p> <p>0 1</p> <p>2 3</p> <p>4 5</p> <p>6 7</p> <p>8 9</p> <p>Operation</p> <p>Save</p> <p>Recall</p> <p>Back</p> <p>DC 20 5.00kV</p> <p>CH1 -19.2kV</p> <p>116Hz</p>
Pozitivni	 <p>Measure</p> <p>Frequency</p> <p>?</p> <p>Period</p> <p>?</p> <p>Mean</p> <p>0.00V</p> <p>Pk-Pk</p> <p>21.5kV</p> <p>Frequency</p> <p>?</p> <p>Maximum</p> <p>21.4kV</p> <p>+Pulse Width</p> <p>100.0ns</p> <p>Rise Time</p> <p>80.00ns</p> <p>Modify</p> <p>AC 20 4.28kV</p> <p>CH1 14.5kV</p> <p>56Hz</p>

4.2. RASPRAVA

Cilj eksperimentalnog dijela ovog rada bio je odrediti utjecaj hladne plinske plazme na čistu kulturu *Escherichia coli* MG1655 pri atmosferskom tlaku i različitim uvjetima tretiranja. Hladnom plinskom plazmom obrađeno je 48 uzoraka koji su raspodijeljeni u faktorski plan sa pet operativnih varijabli (vrijeme tretiranja, električna provodljivost, polaritet plazme, upotrijebljeni plin te frekvencija). Na uzorcima određivano je i analizirano stvaranje slobodnih radikala tj. vodikovog peroksida, rekuperaciju stanica nakon tretiranja, stvaranje biofilma stanica prije i nakon tretmana hladnom plazmom, koncentraciju stanica prije i nakon tretiranja te istjecanje staničnog sadržaja pri 260 nm i 280 nm. Također smo pratili i promjenu (povećanje) u temperaturi uzorka sa vremenom tretiranja. Svi rezultati prikazani u tablici 1 su razlika početnog broja i broja nakon tretiranja.

Rezultati izraženi kao log CFUmL⁻¹, apsorbancija pri 260 nm i 280 nm, postotak rekuperacije, biofilm, koncentracija slobodnih radikala točnije H₂O₂ (mgL⁻¹) te promjena temperature prikazani su u tablici 1. Za navedene rezultate provedena je statistička analiza u programu STATGRAPHICS Centurion, a određivao se učinak svake od pet varijabli te njihovih kombinacija na inaktivaciju *Escherichia coli* MG1655. Svih pet varijabli proučeno je koeficijentom međusobnog množenja te kvadratnim i linearnim koeficijentom.

4.2.1. Log CFUmL⁻¹

U tablici 2 možemo vidjeti kako svaki od procijenjenih učinaka i njihove interakcije utječu na log CFUmL⁻¹. Također je prikazana standardna pogreška svakog od navedenih učinaka, koja mjeri njihovu pogrešku uzorkovanja. Najveći faktor inflacije varijance (variance inflation factor, V.I.F.) je 1,0 za sve učinke. Za savršeno ortogonalni dizajn svi faktori moraju biti 1, a faktori od 10 ili veći se interpretiraju kao indikacija ozbiljne konfuzije među učincima.

Pareto dijagram vidljiv u tablici 5 prikazuje procjenu učinaka na log CFUmL⁻¹ po padajućem redoslijedu važnosti. Kao značajniji učinci na log CFUmL⁻¹ ističu se električna provodljivost, plin, vrijeme, DD (frekvencija na kvadrat) i AB (kombinacija plin i električna

provodljivost). Da bi se procijenila statistička značajnost učinaka, provedena je ANOVA - analiza varijanci.

U tablici 3 prikazana je ANOVA razdioba varijabilnosti za $\log CFU_{mL}^{-1}$ u posebne dijelove za svaki od učinaka. Ona zatim ispituje statističku važnost svakog učinka usporedbom srednjeg odstupanja sa procjenom eksperimentalne pogreške. U ovom slučaju, 5 učinaka i to plin, električna provodljivost, vrijeme te kombinacije AB i DD imaju P-vrijednosti manje od 0,05 tj. redom su 0,0003, 0,0000, 0,0059, 0,0416, 0,0409 što ukazuje da su značajno različiti od nule pri razini pouzdanosti (confidence level, CL) od 95,0%.

U tablici 9 možemo vidjeti statističke parametre regresije i analize za $\log CFU_{mL}^{-1}$. Koeficijent determinacije, R^2 ukazuje da ovako izrađen model objašnjava 74,2173% varijabilnosti kod $\log CFU_{mL}^{-1}$. Prilagođeni koeficijent determinacije (za stupnjeve slobode), koji je prikladniji za usporedbu modela sa različitim brojkama nezavisnih varijabli, je 60,9101%. Standardna pogreška procjene pokazuje da je standardna devijacija zaostataka 0,94334. Srednje apsolutno odstupanje (mean absolute error, MAE) od 0,48783 je prosječna vrijednost zaostataka. Durbin-Watson, DW statistika ispituje zaostatke kako bi se utvrdilo postoji li statistički značajna korelacija s obzirom na redoslijed kojim se pojavljuju među podacima. Budući da je P-vrijednost veća od 5,0 % nema indikacije serijske autokorekcije zaostataka na razini značajnosti od 5,0 %.

U tablici 5 možemo vidjeti grafički prikaz utjecaja električne provodljivosti, plina, polariteta, frekvencije i vremena na $\log CFU_{mL}^{-1}$. U tablici 6 vidimo procijenjenu trodimenzionalnu odzivnu površinu koja prikazuje linearne i interaktivne učinke nezavisnih varijabli na $\log CFU_{mL}^{-1}$. Trodimenzionalni prikaz je dobiven variranjem dva faktora/učinka (električne provodljivosti i plina) u kombinaciji sa $\log CFU_{mL}^{-1}$ dok su ostali faktori/učinci konstantni (polaritet = 0,5, frekvencija = 90,0 Hz, vrijeme = 7,5 min). Tablica 6 također prikazuje i konturni dijagram procijenjene površine odgovora za $\log CFU_{mL}^{-1}$ uz polaritet (0,5), frekvenciju (90 Hz) i vrijeme (7,5 min) kao konstante.

Kao optimalni uvjeti za povećanje $\log CFU_{mL}^{-1}$, vidljivi u tablici 4, utvrđeni su plin od 0,999951, električna provodljivost od $100 \mu S_{cm}^{-1}$, polaritet od $1,50369 \cdot 10^{-8}$, frekvencija od 71,4457 Hz i vrijeme od 9,99869 min. Optimalna vrijednost $\log CFU_{mL}^{-1}$ je 5,17892. Vidljivo je da $\log CFU_{mL}^{-1}$ raste primjenom argona kao plina i negativnog polariteta te povećanjem vremena tretiranja i frekvencije, dok opada povećanjem električne provodljivosti.

Tablica 7 prikazuje graf ovisnosti redukcije broja stanica ($\log \text{CFU mL}^{-1}$) *Escherichie coli* MG1655 o vremenu i frekvenciji uz električnu provodljivost od $100 \mu\text{Scm}^{-1}$ i zrak, te graf uz električnu provodljivost od $100 \mu\text{Scm}^{-1}$ i plin argon. Kod tretmana pri $100 \mu\text{Scm}^{-1}$ i zrak najveći postignuti logaritam redukcije je 2,68 ostvaren uz frekvenciju od 60 Hz i nakon 10 min tretiranja. Tretmanom pri $100 \mu\text{Scm}^{-1}$ i argon najveći postignuti log redukcije stanica je 7,8 dobiven pri 90 Hz i nakon 10 min tretiranja. Usporedbom ova dva grafa vidimo da je bolja redukcija uz argon, 90 Hz i trajanje od 10 min.

U tablici 7 je također prikazan i graf ovisnosti redukcije broja stanica *Escherichia coli* MG1655 o vremenu i frekvenciji uz električnu provodljivost od $800 \mu\text{Scm}^{-1}$ i zrak, te graf uz električnu provodljivost od $800 \mu\text{Scm}^{-1}$ i argon. Vidimo da je pri $800 \mu\text{Scm}^{-1}$ i zrak najveći logaritam redukcije stanica 1 i to uz 90 Hz i trajanje tretmana 10 min. Sa grafa ovisnosti pri $800 \mu\text{Scm}^{-1}$ i argon vidimo da je najveći postignuti logaritam redukcije 1,98 ostvaren pri frekvenciji od 120 Hz i 10 minutnom tretmanu. Možemo zaključiti da je nešto bolja redukcija ostvarena u atmosferi argona.

Ulbin-Figlewicz i Jarmoluk (2015) su u svom radu također utvrdili da povećavanjem vremena tretiranja hladnom plazmom od 2 do 10 minuta dolazi do značajnije redukcije stanica *E. coli*. Zbog povećane osjetljivosti *E. coli* na hladnu plazmu, tretmanom od 30 s i 60 s postigli su redukciju od 4 log primjenom hladne plazme u atmosferi argona i kisika.

Usporedbom sva 4 grafa iz tablice 7 možemo uočiti da je bolja redukcija stanica *Escherichia coli* MG1655 postignuta kod tretmana pri $100 \mu\text{Scm}^{-1}$, a kada gledamo primijenjeni plin još je bolja uz argon, ali i duže tretiranje (10 min). Dobra redukcija stanica je indikator učinkovite inaktivacije stanica *E. coli* MG1655. *Ziuzina i sur. (2014)* u svom radu dobivaju slične rezultate kod tretmana stanica *E. coli* atmosferskom hladnom plazmom.

4.2.2. Temperatura

Tablica 2 prikazuje svaki od procijenjenih učinaka i njihove interakcije na temperaturu. Također je prikazana standardna pogreška svakog od navedenih učinaka, koja mjeri njihovu pogrešku uzorkovanja. V.I.F. je 1,0 za sve učinke.

Pareto dijagram vidljiv u tablici 5 prikazuje procjenu učinaka na temperaturu po padajućem redoslijedu važnosti. Kao značajniji učinci na temperaturu ističu se vrijeme,

frekvencija, AD (kombinacija plina i frekvencije), AE (kombinacija plina i vremena), i BD (kombinacije električne provodljivosti i frekvencije). Da bi se procijenila statistička značajnost učinaka, provedena je ANOVA - analiza varijanci.

U tablici 3 prikazana je ANOVA razdioba varijabilnosti za temperaturu u posebne dijelove za svaki od učinaka. Ona zatim ispituje statističku važnost svakog učinka usporedbom srednjeg odstupanja sa procjenom eksperimentalne pogreške. U ovom slučaju, 5 učinaka i to frekvencija, vrijeme i kombinacije AD, AE i BD imaju P-vrijednosti manje od 0,05 tj. redom su 0,0000, 0,0000, 0,0029, 0,0199, 0,0259 što ukazuje da su značajno različiti od nule pri CL od 95,0%.

U tablici 9 možemo vidjeti statističke parametre regresije i analize za temperaturu. Koeficijent determinacije, R^2 ukazuje da ovako izrađen model objašnjava 86,7747 % varijabilnosti kod temperature. Prilagođeni koeficijent determinacije (za stupnjeve slobode), koji je prikladniji za usporedbu modela sa različitim brojkama nezavisnih varijabli, je 79,9488%. Standardna pogreška procjene pokazuje da je standardna devijacija zaostataka 1,29975. MAE od 0,817795 je prosječna vrijednost zaostataka. DW statistika ispituje zaostatke kako bi se utvrdilo postoji li statistički značajna korelacija s obzirom na redoslijed kojim se pojavljuju među podacima. Budući da je P-vrijednost veća od 5,0 % nema indikacije serijske autokorekcije zaostataka na razini značajnosti od 5,0 %.

Tablica 5 prikazuje grafički prikaz utjecaja električne provodljivosti, plina, polariteta, frekvencije i vremena na temperaturu. U tablici 6 vidimo procijenjenu trodimenzionalnu odzivnu površinu koja prikazuje linearne i interaktivne učinke nezavisnih varijabli na temperaturu. Trodimenzionalni prikaz je dobiven variranjem dva faktora/učinka (električne provodljivosti i plina) u kombinaciji sa temperaturom dok su ostali faktori/učinci konstantni (polaritet = 0,5, frekvencija = 90,0 Hz, vrijeme = 7,5 min). Tablica 6 prikazuje i konturni dijagram procijenjene površine odgovora za temperaturu uz polaritet (0,5), frekvenciju (90 Hz) i vrijeme (7,5 min) kao konstante.

Kao optimalni uvjeti za smanjivanje temperature, vidljivi u tablici 4, utvrđeni su plin 0,0, električna provodljivost od 800 $\mu\text{S}/\text{cm}$, polaritet od 0,0, frekvencija od 60,0 Hz i vrijeme od 5,0 minuta. Optimalna vrijednost temperature je 2,66667. Vidljivo je da temperatura raste povećanjem električne provodljivosti, a opada smanjivanjem frekvencije i vremena tretiranja te primjenom pozitivnog polariteta i zraka kao plina.

Važno je znati da kako temperatura raste sa trajanjem procesa tretiranja, da se isto tako smanjuje brzina stvaranja ozona.

4.2.3. Slobodni radikali

Tablica 2 prikazuje svaki od procijenjenih učinaka i njihove interakcije na stvaranje slobodnih radikala. Također je prikazana standardna pogreška svakog od navedenih učinaka, koja mjeri njihovu pogrešku uzorkovanja. V.I.F. je 1,0 za sve učinke.

Pareto dijagram vidljiv u tablici 5 prikazuje procjenu učinaka na slobodne radikale po padajućem redoslijedu važnosti. Kao značajniji učinci na slobodne radikale ističu se vrijeme, električna provodljivost, BC (kombinacija električne provodljivosti i polariteta), plin i DD (frekvencija na kvadrat). Da bi se procijenila statistička značajnost učinaka, provedena je ANOVA - analiza varijanci.

U tablici 3 prikazana je ANOVA razdioba varijabilnosti za slobodne radikale u posebne dijelove za svaki od učinaka. Ona zatim ispituje statističku važnost svakog učinka usporedbom srednjeg odstupanja sa procjenom eksperimentalne pogreške. U ovom slučaju, 5 učinaka i to plin, električna provodljivost, vrijeme i kombinacije BC i DD imaju P-vrijednosti manje od 0,05 tj. redom su 0,0151, 0,0000, 0,0000, 0,0077, 0,0235 što ukazuje da su značajno različiti od nule pri CL od 95,0 %.

U tablici 9 možemo vidjeti statističke parametre regresije i analize za slobodne radikale. Koeficijent determinacije, R^2 ukazuje da ovako izrađen model objašnjava 75,4891 % varijabilnosti kod slobodnih radikala. Prilagođeni koeficijent determinacije (za stupnjeve slobode), koji je prikladniji za usporedbu modela sa različitim brojkama nezavisnih varijabli, je 62,8383 %. Standardna pogreška procjene pokazuje da je standardna devijacija zaostataka 3,02343. MAE od 1,89208 je prosječna vrijednost zaostataka. DW statistika ispituje zaostatke kako bi se utvrdilo postoji li statistički značajna korelacija s obzirom na redoslijed kojim se pojavljuju među podacima. Budući da je P-vrijednost veća od 5,0 % nema indikacije serijske autokorekcije zaostataka na razini značajnosti od 5,0 %.

U tablici 5 možemo vidjeti grafički prikaz utjecaja električne provodljivosti, plina, polariteta, frekvencije i vremena na slobodne radikale. Tablica 6 prikazuje procijenjenu trodimenzionalnu odzivnu površinu koja prikazuje linearne i interaktivne učinke nezavisnih

varijabli na slobodne radikale. Trodimenzionalni prikaz je dobiven variranjem dva faktora/učinka (električne provodljivosti i plina) u kombinaciji sa slobodnim radikalima dok su ostali faktori/učinci konstantni (polaritet = 0,5, frekvencija = 90,0 Hz, vrijeme = 7,5 min). Tablica 6 prikazuje i konturni dijagram procijenjene površine odgovora za slobodne radikale uz polaritet (0,5), frekvenciju (90 Hz) i vrijeme (7,5 min) kao konstante.

Kao optimalni uvjeti za smanjivanje slobodnih radikala, vidljivi u tablici 4, utvrđeni su plin 0,0, električna provodljivost od 800 μScm^{-1} , polaritet od 0,0, frekvencija od 60,0 Hz i vrijeme od 5,0 minuta. Optimalna vrijednost slobodnih radikala je 2,10604. Vidljivo je da koncentracija slobodnih radikala (H_2O_2) raste povećanjem električne provodljivosti, a opadaju smanjivanjem frekvencije i vremena tretiranja te primjenom pozitivnog polariteta i zraka kao plina. Porast koncentracije H_2O_2 u uzorku ukazuje na povećanje oksidacijskog stresa na stanice *E. coli* MG 1655.

4.2.4. Biofilm

Tablica 2 prikazuje svaki od procijenjenih učinaka i njihove interakcije na biofilm *Escherichia coli* MG1655. Također je prikazana standardna pogreška svakog od navedenih učinaka, koja mjeri njihovu pogrešku uzorkovanja. V.I.F. je 1,0 za sve učinke.

Pareto dijagram vidljiv u tablici 5 prikazuje procjenu učinaka na biofilm po padajućem redoslijedu važnosti. Kao značajniji učinci na biofilm ističu se AB (kombinacija plina i električne provodljivosti), vrijeme, polaritet i električna provodljivost. Da bi se procijenila statistička značajnost učinaka, provedena je ANOVA - analiza varijanci.

U tablici 3 prikazana je ANOVA razdioba varijabilnosti za biofilm u posebne dijelove za svaki od učinaka. Ona zatim ispituje statističku važnost svakog učinka usporedbom srednjeg odstupanja sa procjenom eksperimentalne pogreške. U ovom slučaju, 4 učinka i to električna provodljivost, polaritet, vrijeme i kombinacija AB imaju P-vrijednosti manje od 0,05 tj. redom su 0,0435, 0,0168, 0,0031, 0,0009 što ukazuje da su značajno različiti od nule pri CL od 95,0 %.

U tablici 9 možemo vidjeti statističke parametre regresije i analize za biofilm. Koeficijent determinacije, R^2 ukazuje da ovako izrađen model objašnjava 59,2286 % varijabilnosti kod biofilma. Prilagođeni koeficijent determinacije (za stupnjeve slobode), koji je prikladniji za

usporedbu modela sa različitim brojkama nezavisnih varijabli, je 38,1853 %. Standardna pogreška procjene pokazuje da je standardna devijacija zaostataka 0,109326. MAE od 0,0661875 je prosječna vrijednost zaostataka. DW statistika ispituje zaostatke kako bi se utvrdilo postoji li statistički značajna korelacija s obzirom na redoslijed kojim se pojavljuju među podacima. Budući da je P-vrijednost veća od 5,0 % nema indikacije serijske autokorekcije zaostataka na razini značajnosti od 5,0 %.

U tablici 5 možemo vidjeti grafički prikaz utjecaja plina, električne provodljivosti, polariteta, frekvencije i vremena na biofilm. Tablica 6 nam prikazuje procijenjenu trodimenzionalnu odzivnu površinu koja prikazuje linearne i interaktivne učinke nezavisnih varijabli na biofilm. Trodimenzionalni prikaz je dobiven variranjem dva faktora/učinka (električne provodljivosti i plina) u kombinaciji sa biofilmom dok su ostali faktori/učinci konstantni (polaritet = 0,5, frekvencija = 90,0 Hz, vrijeme = 7,5 min). U tablici 6 možemo vidjeti i konturni dijagram procijenjene površine odgovora za biofilm uz polaritet (0,5), frekvenciju (90 Hz) i vrijeme (7,5 min) kao konstante.

Kao optimalni uvjeti za smanjivanje kapaciteta stvaranja biofilma, vidljivi u tablici 4, utvrđeni su plin 1,0, električna provodljivost od 800 $\mu\text{S}/\text{cm}$, polaritet od 0,0, frekvencija od 60,0 Hz i vrijeme od 5,0 minuta. Optimalna vrijednost biofilma je -0,00254167. Biofilm je zajednica mikroorganizama pričvršćenih na određenu površinu koja je ugrađena u vlastiti ekstracelularni polimerni matriks. Biofilmovi mogu uzrokovati brojne probleme u različitim područjima, kako u medicini (perzistentne i ponavljajuće infekcije, infekcije vezane uz različite uređaje) tako i u ne medicinskim sektorima (stvaranje biofilma u distribucijskim sistemima vode za piće i u okolini u kojoj se procesira hrana) (Carpentier, 2014). Iz dobivenih rezultata je vidljivo da sposobnost *E. coli* MG1655 za stvaranjem biofilma opada povećanjem električne provodljivosti, a raste smanjivanjem frekvencije i vremena tretiranja te primjenom pozitivnog polariteta i argona kao plina. *Ziuzina i sur. (2015)* su u svom radu također utvrdili da i nakon tretmana atmosferskom hladnom plazmom dužeg od 5 min sposobnost stvaranja biofilma *E. coli* ne opada značajno te da sam učinak plazme na stvaranje biofilma može značajno ovisiti o stanju metabolizma bakterija te samoj građi stanice.

Zhang i sur. (2007) u svom radu potvrđuju vezu između oksidacijskog stresa, koji je posljedica stvorenog H_2O_2 , i drugih faktora iz okoline plazmom tretiranih stanica *E. coli* sa stvaranjem biofilma. Utvrdili su da stanice *E. coli* više stvaraju biofilm kada se nalaze u

neadekvatnim uvjetima okoline kao što su kiseli pH, oksidacijski stres, teški metali te hladni šok (22 °C), a smatraju da to može biti jedan od mehanizama zaštite stanica.

4.2.5. Istjecanje staničnog sadržaja pri 260 nm

Tablica 2 prikazuje svaki od procijenjenih učinaka i njihove interakcije na istjecanje staničnog sadržaja pri 260 nm. Također je prikazana standardna pogreška svakog od navedenih učinaka, koja mjeri njihovu pogrešku uzorkovanja. V.I.F. je 1,0 za sve učinke.

Pareto diagram vidljiv u tablici 5 prikazuje procjenu učinaka na istjecanje staničnog sadržaja pri 260 nm po padajućem redoslijedu važnosti. Na dijagramu vidimo da nema značajnijih učinaka na istjecanje staničnog sadržaja pri 260 nm. Da bi se procijenila statistička značajnost učinaka, provedena je ANOVA - analiza varijanci.

U tablici 3 prikazana je ANOVA razdioba varijabilnosti za istjecanje staničnog sadržaja pri 260 nm u posebne dijelove za svaki od učinaka. Ona zatim ispituje statističku važnost svakog učinka usporedbom srednjeg odstupanja sa procjenom eksperimentalne pogreške. U ovom slučaju, niti jedan učinak nema P-vrijednost manju od 0,05 što ukazuje da su značajno različiti od nule pri CL od 95,0 %.

U tablici 9 možemo vidjeti statističke parametre regresije i analize za istjecanje staničnog sadržaja pri 260 nm. Koeficijent determinacije, R^2 ukazuje da ovako izrađen model objašnjava 42,0022 % varijabilnosti kod istjecanje staničnog sadržaja pri 260 nm. Prilagođeni koeficijent determinacije (za stupnjeve slobode), koji je prikladniji za usporedbu modela sa različitim brojkama nezavisnih varijabli, je 12,0679 %. Standardna pogreška procjene pokazuje da je standardna devijacija zaostataka 0,0762699. MAE od 0,0368837 je prosječna vrijednost zaostataka. DW statistika ispituje zaostatke kako bi se utvrdilo postoji li statistički značajna korelacija s obzirom na redoslijed kojim se pojavljuju među podacima. Budući da je P-vrijednost veća od 5,0 % nema indikacije serijske autokorekcije zaostataka na razini značajnosti od 5,0 %.

U tablici 5 možemo vidjeti grafički prikaz utjecaja električne provodljivosti, plina, polariteta, frekvencije i vremena na istjecanje staničnog sadržaja pri 260 nm. Tablica 6 nam prikazuje procijenjenu trodimenzionalnu odzivnu površinu koja prikazuje linearne i interaktivne učinke nezavisnih varijabli na istjecanje staničnog sadržaja pri 260 nm.

Trodimenzijski prikaz je dobiven variranjem dva učinka (električne provodljivosti i plina) u kombinaciji sa istjecanje staničnog sadržaja pri 260 nm dok su ostali učinci konstantni (polaritet = 0,5, frekvencija = 90,0 Hz, vrijeme = 7,5 min). Tablica 6 nam prikazuje i konturni dijagram procijenjene površine odgovora za istjecanje staničnog sadržaja pri 260 nm uz polaritet (0,5), frekvenciju (90 Hz) i vrijeme (7,5 min) kao konstante.

Kao optimalni uvjeti za povećanje istjecanja staničnog sadržaja pri 260 nm, vidljivi u tablici 4, utvrđeni su plin 1,0, električna provodljivost od $100 \mu\text{Scm}^{-1}$, polaritet od 1,0, frekvencija od 60,0 Hz i vrijeme od 5,0 minuta. Optimalna vrijednost istjecanje staničnog sadržaja pri 260 nm je 0,258729. Vidljivo je da istjecanje staničnog sadržaja pri 260 nm raste primjenom argona kao plina i negativnog polariteta, a opada smanjivanjem frekvencije, električne provodljivosti i vremena tretiranja.

4.2.6. Istjecanje staničnog sadržaja pri 280 nm

Tablica 2 prikazuje svaki od procijenjenih učinaka i njihove interakcije na istjecanje staničnog sadržaja pri 280 nm. Također je prikazana standardna pogreška svakog od navedenih učinaka, koja mjeri njihovu pogrešku uzorkovanja. V.I.F. je 1,0 za sve učinke.

Pareto dijagram vidljiv u tablici 5 prikazuje procjenu učinaka na istjecanje staničnog sadržaja pri 280 nm po padajućem redoslijedu važnosti. Kao značajniji učinci ističu se plin, AD (kombinacija plina i frekvencije) i DD (frekvencija na kvadrat). Da bi se procijenila statistička značajnost učinaka, provedena je ANOVA - analiza varijanci.

U tablici 3 prikazana je ANOVA razdioba varijabilnosti za istjecanje staničnog sadržaja pri 260 nm u posebne dijelove za svaki od učinaka. Ona zatim ispituje statističku važnost svakog učinka usporedbom srednjeg odstupanja sa procjenom eksperimentalne pogreške. U ovom slučaju, 3 učinka i to plin te kombinacije AD i DD imaju P-vrijednosti manje od 0,05 tj. redom su 0,0133, 0,0336, 0,0408 što ukazuje da su značajno različiti od nule pri CL od 95,0%.

U tablici 9 možemo vidjeti statističke parametre regresije i analize za istjecanje staničnog sadržaja pri 280 nm. Koeficijent determinacije, R^2 ukazuje da ovako izrađen model objašnjava 54,8806 % varijabilnosti kod istjecanje staničnog sadržaja pri 280 nm. Prilagođeni koeficijent determinacije (za stupnjeve slobode), koji je prikladniji za usporedbu modela sa

različitim brojkama nezavisnih varijabli, je 31,5931 %. Standardna pogreška procjene pokazuje da je standardna devijacija zaostataka 0,0121647. MAE od 0,00795295 je prosječna vrijednost zaostataka. DW statistika ispituje zaostatke kako bi se utvrdilo postoji li statistički značajna korelacija s obzirom na redoslijed kojim se pojavljuju među podatcima. Budući da je P-vrijednost veća od 5,0 % nema indikacije serijske autokorekcije zaostataka na razini značajnosti od 5,0 %.

U tablici 5 možemo vidjeti grafički prikaz utjecaja plina, električne provodljivosti, polariteta, frekvencije i vremena na istjecanje staničnog sadržaja pri 280 nm. Tablica 6 nam prikazuje procijenjenu trodimenzionalnu odzivnu površinu koja prikazuje linearne i interaktivne učinke nezavisnih varijabli na istjecanje staničnog sadržaja pri 280 nm. Trodimenzionalni prikaz je dobiven variranjem dva učinka (električne provodljivosti i plina) u kombinaciji sa istjecanje staničnog sadržaja pri 280 nm, dok su ostali učinci konstantni (polaritet = 0,5, frekvencija = 90,0 Hz, vrijeme = 7,5 min). Tablica 6 nam prikazuje i konturni dijagram procijenjene površine odgovora za istjecanje staničnog sadržaja pri 260 nm uz polaritet (0,5), frekvenciju (90 Hz) i vrijeme (7,5 min) kao konstante.

Kao optimalni uvjeti za povećanje istjecanja staničnog sadržaja pri 260 nm, vidljivi u tablici 4, utvrđeni su plin 1,0, električna provodljivost od $100 \mu\text{Scm}^{-1}$, polaritet od 1,0, frekvencija od 60,4493 Hz i vrijeme od 10,0 minuta. Optimalna vrijednost istjecanja staničnog sadržaja pri 280 nm je 0,0560352. Vidljivo je da istjecanje staničnog sadržaja pri 280 nm raste povećanjem frekvencije i vremena tretiranja te primjenom negativnog polariteta i argona kao plina, a opada smanjivanjem električne provodljivosti.

4.2.7. Rekuperacija

Tablica 2 prikazuje svaki od procijenjenih učinaka i njihove interakcije na rekuperaciju. Također je prikazana standardna pogreška svakog od navedenih učinaka, koja mjeri njihovu pogrešku uzorkovanja. V.I.F. je 1,0 za sve učinke.

Pareto dijagram vidljiv u tablici 5 prikazuje procjenu učinaka na rekuperaciju po padajućem redoslijedu važnosti. Kao značajniji učinci na rekuperaciju ističu se električna provodljivost, AB (kombinacija plina i električne provodljivosti), vrijeme, DD (frekvencija na

kvadrat) i plin. Da bi se procijenila statistička značajnost učinaka, provedena je ANOVA - analiza varijanci.

U tablici 3 prikazana je ANOVA razdioba varijabilnosti za rekuperaciju u posebne dijelove za svaki od učinaka. Ona zatim ispituje statističku važnost svakog učinka usporedbom srednjeg odstupanja sa procjenom eksperimentalne pogreške. U ovom slučaju, 5 učinaka i to plin, električna provodljivost, vrijeme te kombinacije AB i DD imaju P-vrijednosti manje od 0,05 tj. redom su 0,0318, 0,0000, 0,0007, 0,0001, 0,0084 što ukazuje da su značajno različiti od nule pri CL od 95,0 %.

U tablici 9 možemo vidjeti statističke parametre regresije i analize za rekuperaciju. Koeficijent determinacije, R^2 ukazuje da ovako izrađen model objašnjava 73,029 % varijabilnosti kod rekuperacije. Prilagođeni koeficijent determinacije (za stupnjeve slobode), koji je prikladniji za usporedbu modela sa različitim brojkama nezavisnih varijabli, je 59,1085%. Standardna pogreška procjene pokazuje da je standardna devijacija zaostataka 0,97868. MAE od 0,586059 je prosječna vrijednost zaostataka. DW statistika ispituje zaostatke kako bi se utvrdilo postoji li statistički značajna korelacija s obzirom na redoslijed kojim se pojavljuju među podacima. Budući da je P-vrijednost veća od 5,0 % nema indikacije serijske autokorekcije zaostataka na razini značajnosti od 5,0 %.

U tablici 5 možemo vidjeti grafički prikaz utjecaja električne provodljivosti, plina, polariteta, frekvencije i vremena na rekuperaciju. Tablica 6 prikazuje procijenjenu trodimenzionalnu odzivnu površinu koja prikazuje linearne i interaktivne učinke nezavisnih varijabli na rekuperaciju. Trodimenzionalni prikaz je dobiven variranjem dva učinka (električne provodljivosti i plina) u kombinaciji sa rekuperacijom dok su ostali učinci konstantni (polaritet = 0,5, frekvencija = 90,0 Hz, vrijeme = 7,5 min). Tablica 6 nam prikazuje i konturni dijagram procijenjene površine odgovora za rekuperaciju uz polaritet (0,5), frekvenciju (90 Hz) i vrijeme (7,5 min) kao konstante.

Kao optimalni uvjeti za smanjivanje rekuperacije, vidljivi u tablici 4, utvrđeni su plin 1,0, električna provodljivost od $800 \mu\text{Scm}^{-1}$, polaritet od 1,0, frekvencija od 60,0 Hz i vrijeme od 5,0 minuta. Optimalna vrijednost rekuperacije je -0,0279167. Vidljivo je da rekuperacija raste povećanjem električne provodljivosti, a opada smanjivanjem frekvencije i vremena tretiranja te primjenom pozitivnog polariteta i argona kao plina.

Tablica 8 prikazuje je graf ovisnosti postotka rekuperacije *Escherichia coli* MG1655 o vremenu i frekvenciji uz električnu provodljivost od $100 \mu\text{Scm}^{-1}$ i zrak, te graf uz električnu

provodljivost od $100 \mu\text{Scm}^{-1}$ i plin argon. Na temelju dobivenih grafičkih prikaza možemo uočiti lošiju rekuperaciju stanica u atmosferi plina argona što nam govori da je djelotvornija inaktivacija *E. coli* MG1655 u atmosferi argona nego zraka te da je manja rekuperacija stanica kod primjene viših frekvencija (120 Hz).

U tablici 8 je također prikazan graf ovisnosti postotka rekuperacije *Escherichia coli* MG1655 o vremenu i frekvenciji uz električnu provodljivost od $800 \mu\text{Scm}^{-1}$ i zrak, te graf uz električnu provodljivost od $800 \mu\text{Scm}^{-1}$ i argon. Usporedbom ova dva grafa možemo zaključiti da su kod električne provodljivosti od $800 \mu\text{Scm}^{-1}$ postignute lošije rekuperacije stanica upotrebom plina argona. Također se vidi lošija rekuperacija stanica kod tretmana provedenih na višim frekvencijama (120 Hz).

Usporedbom grafova ovisnosti postotka rekuperacije kod $100 \mu\text{Scm}^{-1}$ i grafova kod $800 \mu\text{Scm}^{-1}$ možemo uočiti lošiju rekuperaciju stanica *E. coli* MG1655 kod tretmana pri $100 \mu\text{Scm}^{-1}$ nego kod tretmana sa $800 \mu\text{Scm}^{-1}$. Također je lošija rekuperacija kod tretmana u trajanju od 10 minuta, u usporedbi sa rekuperacijom kod tretmana u trajanju od 5 minuta. Lošija rekuperacija stanica nam ukazuje da je inaktivacija stanica *E. coli* MG1655 u takvim uvjetima učinkovitija.

Tablica 10 prikazuje pozitivan i negativan naponski val očitao na osciloskopu tijekom tretmana hladnom plinskom plazmom.

Da bi pokušali objasniti mehanizam inaktivacije stanica *Escherichia coli* MG1655 hladnom plinskom atmosferskom plazmom potrebno je prisjetiti se kako plazma nastaje te do kojih fizikalnih i kemijskih promjena dolazi u plazma fazi što je opisano u teorijskom dijelu ovog rada. Pod djelovanjem plazme, bakterijske stanice mogu biti inaktivirane jednim od 4 poznata faktora ili njihovim sinergističkim djelovanjem. Ti faktori su toplina, UV radijacija, nabijene čestice te reaktivne neutralne vrste. Ovisno o tipu plazme tj. operativnim parametrima (snaga, plin i brzina protoka), utjecaj svakog od navedenih faktora varira. Prilikom tretmana plinskom atmosferskom plazmom elektroda je u atmosferi argona ili zraka neposredno iznad površine suspenzije uzorka (Laroussi i Leipold, 2004).

Zbog određene udaljenosti elektrode od samog uzorka najmanji inaktivacijski učinak imaju nabijene čestice. Što se tiče topline tj. temperature, ona svojim porastom tijekom tretiranja ne ukazuje na značajniji termalni učinak na bakterijske stanice. Kada govorimo o potencijalnoj inaktivaciji stanica UV zračenjem tada se to odnosi na njihovu sposobnost dimerizacije timina, nukleinske baze unutar DNA bakterijskih stanica. Na taj način UV

zračenje sprječava pravilno repliciranje stanica. Utvrđeno je da optimalni efekt ima UV zračenje od 220 – 280 nm i nekoliko doza mWscm^{-2} . Unatoč tome, u ovakvoj nisko temperaturnoj plinskoj plazmi ne očekuje se značajnija inaktivacija stanica ovim sterilizacijskim procesom (Lukes i sur., 2004).

U visokotlačnim neravnotežnim plazmama, reaktivne vrste se stvaraju kroz razne kolizijske putanje kao što su ekscitacija i disocijacija elektronskim sudarom. Reaktivne vrste igraju važnu ulogu u svim plazma-površina interakcijama. Plazme u atmosferi zraka su odličan izvor reaktivnih kisikovih vrsta (reactive oxygen species, ROS) i reaktivnih dušikovih vrsta (reactive nitrogen species, RNS) kao što su atomski kisik (O), ozon (O_3), hidroksil radikal (OH), NO, NO_2 itd. Nastale reaktivne vrste imaju direktan učinak na stanice mikroorganizama, a naročito na njihove najudaljenije dijelove membrana. Membrane su izgrađene od lipidnih dvosloja, a važan dio te membrane su nezasićene masne kiseline koje joj daju strukturu sličnu gelu. Takva struktura omogućuje transport biokemijskih nusproizvoda kroz membranu. Budući da su te nezasićene masne kiseline osjetljive na napade OH radikala, njegova prisutnost kompromitira funkciju membranskih lipida čija je uloga da se ponašaju kao barijera za transport iona i polarnih sastojaka u i van stanice. U same lipide su umrežene i proteinske molekule koje također kontroliraju prijenos različitih komponenata. Proteini su, možemo reći, linearni lanci aminokiselina koje su također osjetljive na oksidaciju kada se nalaze u okolini bogatoj plazma radikalima. Iz toga možemo zaključiti da kod ovog tipa plazmi upravo reaktivne vrste uvelike kompromitiraju integritet stanica mikroorganizama i dovode do eventualne destrukcije (Laroussi i Leipold, 2004). Upravo visoko reaktivne vrste, kao što su vodikov peroksid (u tekućoj fazi) te ozon (u plinovitoj fazi) imaju ključnu ulogu u uništavanju mikroorganizama - *Escherichia coli* MG1655 kao i UV zračenje dok toplina nema značajnijeg utjecaja na redukciju stanica.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata i provedene rasprave može se zaključiti sljedeće:

1. Najbolja redukcija stanica bakterije *Escherichia coli* MG1655 i to od 7,8 log ostvarena je uz sljedeće uvjete: električna provodljivost suspenzije $100 \mu\text{Scm}^{-1}$, frekvencija 90 Hz, 10 min tretiranja i plin argon.
2. Vidljivo je da koncentracija slobodnih radikala (H_2O_2) raste povećanjem električne provodljivosti, a opada smanjivanjem frekvencije i vremena tretiranja te primjenom pozitivnog polariteta i zraka kao plina. Veća količina H_2O_2 uzrokuje veći oksidacijski stres stanica.
3. Stvaranje biofilma *Escherichia coli* MG 1655 raste povećanjem električne provodljivosti, a opada smanjivanjem frekvencije i vremena tretiranja te primjenom pozitivnog polariteta i argona kao plina. Oksidacijski stres stanica *E. coli* MG1655 doprinosi povećanom stvaranju biofilma.
4. Istjecanje staničnog sadržaja pri 260 nm raste primjenom argona i negativnog polariteta, a opada smanjivanjem frekvencije, električne provodljivosti i vremena tretiranja dok istjecanje staničnog sadržaja pri 280 nm raste povećanjem frekvencije i vremena tretiranja te primjenom negativnog polariteta i argona kao plina, a opada smanjivanjem električne provodljivosti.
5. Utvrđeno istjecanje staničnog sadržaja pri 260 i 280 nm ukazuje na gubitak unutarstaničnih proteina i nukleinskih kiselina, no to istjecanje je minimalno te se stanice *Escherichia coli* MG1655 dobro rekuperiraju nakon tretmana hladnom atmosferskom plinskom plazmom.
6. Stanice *Escherichia coli* MG1655 su pokazale lošiju rekuperaciju nakon tretmana u otopini električne provodljivosti $800 \mu\text{Scm}^{-1}$ u usporedbi sa onima električne provodljivosti $100 \mu\text{Scm}^{-1}$. Lošija rekuperacija je vidljiva i s obzirom na primijenjeni plin pri čemu se argon pokazao kao učinkovitiji. Rekuperacija stanica lošija je primjenom dužeg vremena tretiranja.

6. LITERATURA

Bardos, L., Barankova, H. (2010) Cold atmospheric plasma: Sources, processes, and applications. *Thin Solid Films* **518**, 6705-6713.

Bartnikas, R., McMahon, E. J. (1979) *Engineering dielectrics: 1st volume corona measurement and interpretation*. American society for testing and materials, Philadelphia.

Bogaerts, A., Neyts, E., Gijbels, R., Mullen, van der J. (2002) Gas discharge plasmas and their applications. *Spectrochim acta B* **57**, 609-658 str.

Carpentier, B. (2014) Biofilms. U: *Encyclopedia of Food Microbiology*, 2. izd. (Batt, C.A. i Tortorello, M., ured.), Elsevier Ltd., London/Burlington/San Diego, 259 – 265 str.

Chu, P. K., Lu X. (2014) *Low temperature plasma technology: Methods and applications*, CRC Press – Taylor & Francis Group, London.

Fernandez, A., Thompson, A. (2012) The inactivation of Salmonella by cold atmospheric plasma treatment, *Food Res Int* **45**, 678-684 str.

Gasanova, S. (2013) Aqueous-phase electrical discharges: generation, investigation and application for organics removal from water. *Institute for Instrumental Analytical chemistry*, University Duisburg-Essen.

Khuri, A. I., Cornell, J. A., (1996) *Response Surfaces: Design and Analyses*, Marcel Dekker, New York.

Kozakova, Z. (2013) *Electric discharges in water solutions*. Vutium, Brno.

Kuehl, R. O. (2000) *Design of Experiments: Statistical Principles of Research Design and Analysis*, Duxbury Press, Pacific Grove.

Laroussi, M., Leipold, F. (2004) Evaluation of the roles of reactive species, heat, and UV adiation in the inactivation of bacterial cells by air plasmas at atmospheric pressure. *Int J Mass Spectrom* **233**, 81-86.

Lovitt, R. W., Wright, C. J. (2014) The bacterial cell. U: *Encyclopedia of Food Microbiology*, 2. izd. (Batt, C.A. i Tortorello, M., ured.), Elsevier Ltd., London/Burlington/San Diego, str. 151-160.

Lukes, P., Appleton, A. T., Locke, B. R. (2004) Hydrogen peroxide and ozone formation in hybrid gas-liquid electrical discharge reactors. *Ieee T. Ind. Appl.* **40**, 60-67 str.

Mayerhoff, E. (2007) *Corona and its effects*, High Voltage Connection, New York.

Misra, N. N., Tiwari, B. K., Raghavarao, K. S. M. S., Cullen, P. J. (2011) *Nonthermal plasma inactivation of food-borne pathogens*, School of food science and environmental health, Dublin.

Myers, R.H., Montgomery, D.C. (2002) *Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments*, John Wiley & Sons, Hoboken, New York.

Patel, A.K., Singhania, R.R., Pandey, A., Joshi, V.K., Nigam, P.S., Soccol, C.R. (2014) *Enterobacteriaceae, coliforms and E. Coli*. U: *Encyclopedia of Food Microbiology*, 2. izd. (Batt, C.A. i Tortorello, M., ured.), Elsevier Ltd., London/Burlington/San Diego, str. 659-695.

Peeters, E., Nelis, H. J., & Coenye, T. (2008). Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *J Microbiol. Meth.* **72**, 157 - 165 str.

Prieto-Calvo, M., Prieto, M., López, M., & Alvarez-Ordóñez, A. (2014). Effects of high hydrostatic pressure on *Escherichia coli* ultrastructure, membrane integrity and molecular composition as assessed by FTIR spectroscopy and microscopic imaging techniques. *Molecules* **19**, 21310-21323 str.

Reynolds, J. (2011) *Counting bacteria*. Richland Collage, Dallas.

Song, H.P., Kim, B., Choe, Ho J., Jung, S., Moon, Se Y., Choe, W., Jo, C. (2009) Evaluation of atmospheric pressure plasma to improve the safety of sliced cheese and ham inoculated by 3-strain cocktail *Listeria monocytogenes*. *Food microbiol.* **26**, 432-436 str.

Stewart, S. L., Grinshpun, S. A., Willeke, K., Terzieva, S., Ulevicius, V., & Donnelly, J. (1995). Effect of impact stress on microbial recovery on an agar surface. *Appl. Environ. Microb.* **61**, 1232-1239 str.

Tendero, C., Tixier, C., Tristant, P., Desmaison, J., Leprince, P. (2006) Atmospheric pressure plasmas: A review. *Spectrochim. Acta B* **61**, 2 – 30 str.

Ulbin-Figlewicz, N., Jarmoluk, A. (2015) Antimicrobial activity of low-pressure plasma treatment against selected foodborne bacteria and meat microbiota. *Ann. Microbiol.* **65**, 1537-1546 str.

Wikipedia (2008) Gram negativna bakterija, https://hr.wikipedia.org/wiki/Gram-negativna_bakterija Pristupljeno 12.7.2016.

Yun, H., Kim, B., Jung, S., Kruk, Z. A., Kim, D. B., Choe, W., Jo, C. (2010) Inactivation of *Listeria monocytogenes* inoculated on disposable plastic tray, aluminium foil, and paper cup by atmospheric pressure plasma. *Food Control* **21**, 1182-1186 str.

Zhang, X.S., Garcia-Contreras, R., Wood, T.K. (2007) YcfR (BhsA) Influences *Escherichia coli* biofilm formation through stress response and surface hydrophobicity. *J. Microbiol.* **189**, 3051-3062 str.

Ziuzina, D., Boehm, D., Patil, S., Cullen, P.J., Bourke, P. (2015) Cold plasma inactivation of bacterial biofilms and reduction of quorum sensing regulated virulence factors. *PLoS ONE* 10(9): e0138209. doi:10.1371/journal.pone.0138209

Ziuzina, D., Patil, S., Cullen, P.J., Keener, K.M., Bourke, P. (2014) Atmospheric cold plasma inactivation of *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* and *Listeria monocytogenes* inoculated on fresh produce. *Food Microbiol.* (objavljeno online 11. veljače 2014.). doi: 10.1016/j.fm.2014.02.007

7. PRILOZI

7.1. POPIS SLIKOVNIH PRIKAZA RADA

Slika 1. Prikaz prijelaza stanja materije primjenom topline	2.
Slika 2. Shematski prikaz tipičnih važnih procesa kroz vrijeme	7.
Slika 3. Primjer raspona varijacije za f_{pi} (ionsku frekvenciju) i f_{pe} (frekvencije elektrona) u hladnoj plazmi tj. svjetlećim izbojima	10.
Slika 4. Princip koronarnog pražnjenja.....	11.
Slika 5. Osnovne konfiguracije elektroda: a) vrh-na-vrh, b) vrh-na-ploču, c) ploča-na-ploču, d) žičani cilindar.....	14.
Slika 6. Usporedba staničnih stijenki gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija	16.
Slika 7. Sustav za generiranje plazme u tekućini visokonaponskim pražnjenjem: A) reaktor, B)pumpa, C) visokonaponski generator D) kontrolna jedinica za napajanje, E) otpornici 9,5M Ω F) kondenzator 0,75 nF G) rotirajuća sklopka, H) elektromotor s regulatorom frekvencije.....	20.
Slika 8. Električno pražnjenje u suspenziji čiste kulture <i>Escherichie coli</i> MG1655	22.
Slika 9. Shematski prikaz pražnjenja u plinskoj fazi	22.
Slika 10. Shematski prikaz strujnog kruga	23.
Slika 11. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije vodikovog peroksida nastalog tretiranjem hladnom plazmom	25.

7.2. POPIS TABLICA RADA

Tablica 1. Parametri plinske plazme i rezultati inaktivacije plinskom plazmom.....	27.
Tablica 2. Procijenjeni učinci primjenjenog plina, električne provodljivosti, polariteta, frekvencije i vremena na broj stanica $\log \text{CFU mL}^{-1}$, promjenu temperature, slobodne radikale, biofilm, istjecanje sadržaja i rekuperaciju stanica <i>Escherichie coli</i>	29.
Tablica 3. Analiza varijance parametara plinske plazme (plin, električna provodljivost, polaritet, frekvencija, vrijeme) i njihovih interakcija.....	33.
Tablica 4. Polinomi, optimalne vrijednosti i optimalni faktori za rezultate $\log \text{CFU mL}^{-1}$, temperaturu, slobodne radikale, biofilm, istjecanje staničnog sadržaja pri 260 i 280 nm te rekuperaciju	38.
Tablica 5. Standardizirani Pareto dijagram i grafički prikaz glavnih učinaka na svaki od rezultata	41.
Tablica 6. 3D i konturni dijagrami za svaki od rezultata	43.
Tablica 7. Grafički prikazi ovisnosti $\log \text{CFU mL}^{-1}$ (redukcije broja stanica) o vremenu i frekvenciji.....	46.
Tablica 8. Grafički prikazi ovisnosti postotka rekuperacije o vremenu i frekvenciji	47.
Tablica 9. Statistički parametri regresije i analize	48.
Tablica 10. Grafički prikaz naponskog vala tijekom tretmana plinskom plazmom.....	49.